



AVALIAÇÃO DA RESPOSTA AO STRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR CÁDMIO EM PLANTAS DE ESPINAFRE

Spinacea oleracea L.

Filipa Rego Pinto

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Alimentar

Orientador: Doutora Maria Luísa Louro Martins

Co-orientador: Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: - Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

- Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

- Doutor David Paulo Figueiro, Investigador Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2011

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que, directa ou indirectamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Em particular:

Aos incansáveis Professora Doutora Maria Luísa Louro Martins e Professor Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato por tudo o que me ensinaram, pelo apoio, incentivo, orientação e pelos conselhos amigos e encorajadores que sempre me deram nas alturas mais difíceis.

À FCT pela realização do trabalho no âmbito do Projecto PTDC/AGR-AAM/102821/2008.

Ao instituto Superior de Agronomia da Universidade técnica de Lisboa, especificamente à UIQA (unidade de investigação de química ambiental) pela facilitação de meios e condições necessárias à realização deste trabalho.

À fantástica Rafaela Reis que muito me ensinou no laboratório, me valorizou e sempre me apoiou.

Ao senhor Felício por todos os seus préstimos na parte experimental que decorreu no Horto.

Ao Doutor David Fangueiro pela disponibilização do seu tempo e pelo que me ensinou sobre determinação de azoto nítrico.

À malta do laboratório 17 A, em especial a Inês Moreira e Patrícia Barbosa por todos os momentos que atravessámos juntas, pela sua imprescindível ajuda e compreensão em muitos momentos, incluindo os menos fáceis.

Não sei como agradecer à minha família. Aos pais por me terem dado a oportunidade de realizar este estudo.

Aos manos por me incentivarem, apoiarem como sempre e ajudarem na realização do mesmo.

Ao meu namorado por toda a compreensão, paciência e boa disposição que sempre me transmitiu.

A todos um muito Obrigada!

RESUMO

Neste trabalho foi avaliada a resposta de plantas de espinafre ao stresse induzido por cádmio a concentrações de 25 e 50 μM , durante 7 dias e em meio de cultura líquido.

Foram avaliados parâmetros fisiológicos como comprimento e massa da parte aérea e raiz, número de folhas e biomassa total. Foi também avaliada a concentração de malonaldeído, de peróxido de hidrogénio, azoto nítrico e teor de clorofila por espectrofotometria e método não destrutivo *Hansatech*.

As alterações fisiológicas visíveis das plantas foram pouco evidentes e não se verificaram diferenças significativas em grande parte dos parâmetros avaliados; contudo em plantas contaminadas verificou-se a diminuição do comprimento da parte aérea e raiz, aumento do número de folhas e biomassa total.

As concentrações de MDA e H_2O_2 determinadas foram superiores em plantas contaminadas com 25 μM e os teores de clorofila apresentaram-se menores no ensaio de 50 μM . O teor de cádmio máximo transferido para a planta foi respectivamente, de 0,21 e 5,25 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF em folhas e 0,75 e 13,94 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF na raiz. Verificou-se uma acumulação de Cd nestas plantas pelo que a sua ingestão na alimentação pode constituir uma via de contaminação com Cd da cadeia alimentar.

Palavras chave: Cádmio, Espinafre, *Spinacea oleracea*; Stresse Oxidativo

ABSTRACT

The main objective of this work was to evaluate the response of spinach plants to induced stress by cadmium, at concentrations of 25 and 50 μM , in nutrient solution for 7 days. The maximum cadmium concentration transferred to the plant was, respectively, 0,21 and 5,25 $\mu\text{g g}^{-1}$ FW in leaves and 0,75 and 13,94 $\mu\text{g g}^{-1}$ FW in the roots.

Physiological parameters like shoot and root mass and length, number of leafs and total biomass were evaluated. The concentration of malonaldehyde and hydrogen peroxide was determined by spectrophotometry and the concentration of chlorophyll was measured by spectrophotometry and a non destructive method, *Hansatech*.

The contaminated plants showed a slightly shorter length with more leafs and higher biomass, but most of these changes were not statistically significant.

The concentration of MDA and H_2O_2 was higher in plants contaminated with 25 μM cadmium and the levels of chlorophyll were lower in plants contaminated with 50 μM cadmium.

The correlations of parameters showed that spinach plants showed some sensitivity to 25 μM cadmium concentrations. These plants were shown to be able to absorb and accumulate Cd, which can propagate in the food chain and induce toxic effects in humans and other animals.

Keywords: Cadmium, Spinach, *Spinacea oleracea*; Oxidative Stress

EXTENDED ABSTRACT

The contamination of edible vegetables products by toxic metals, derives mainly from the contamination of the soils or irrigation water. This situation is a growing concern especially in areas where anthropogenic influence is increasing and industrial development is implemented. Consequently, plant contamination by toxic metals can be a problem when plants are tolerant and can cope and even thrive with high metal contents and can accumulate toxic metals in parts consumed by animals and humans. Tolerant plants can develop physiological changes to counteract undesirable stress effects caused by these contaminants. This tolerance is based on defence mechanisms, variable with plant type and toxic metal.

Toxic levels of heavy metals (Cd and Cu) were reported to affect several cell processes in plants. One of the major consequences of this induced stress is the enhanced production of reactive oxygen species (ROS), which can cause oxidative damage on cell components such as lipids, proteins and nucleic acids.

Accumulation of ROS may be the consequence of a disruption of the balance between their production and the removal by antioxidative system composed of enzymatic antioxidants such as catalase, peroxidases and superoxide dismutase, and non-enzymatic scavengers.

Spinach is a vegetable widely consumed all over the world, both in fresh or processed forms (canned, frozen, as soup, purred, etc.) that has a high nutritive value, with an important content in vitamins and minerals. These characteristics make the spinach an important vegetable to study.

In this work it was studied the response of spinach plants (*Spinacea oleracea L.*) grown in non contaminated (T) and contaminated hydroponic solution with cadmium at two concentrations: 25 and 50 μM . The length and weight of shoots and roots, total biomass and number of leaves was determined for all analysed plants. The concentration of chlorophyll, nitric nitrogen, Zn, Cu, Mn, Fe, Ca, Mg and the concentration of produced MDA and H_2O_2 was also determined for all plants in this study.

The uptake of cadmium by spinach plants was 3,72 to 19,26 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW and 288,92 to 491,18 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW in leaves and 2,14 to 70,00 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW and 324,40 to 1311,02 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW in roots, in trials with 25 e 50 μM of cadmium respectively. This shows that there isn't a directly proportional increase.

By assessing the mineral content, the absorbed cadmium appears to directly or indirectly stimulate the absorption of other elements like Zn and Cu by the plant, and suppress the absorption of elements like Ca and Mg. These findings are more clearly shown in plants contaminated with 50 μM .

The length of the contaminated plants generally decreased, the number of leaves and total biomass increased, when compared to control plants, with the exception of total biomass for the concentration 25 μM . The colour of the leaves show no visible variation, but the concentration of chlorophyll shows a small variation. The determination both by spectrophotometry and by a non destructive method

(using a *Hansatech* device) shows decreased levels of chlorophyll in the leaves of contaminated plants with 50 μM .

Cadmium apparently increases both the concentration of MDA and of H_2O_2 in leaves and roots of contaminated plants with 25 μM Cd.

Based in these results and in the correlations between the studied parameters it is possible to state that spinach plants showed some sensitivity to 25 μM Cd, but the effect of the higher concentration of 50 μM apparently was not proportionally higher.

ÍNDICE GERAL

| | |
|---|------|
| Agradecimentos..... | i |
| Resumo | ii |
| Abstract..... | iii |
| Extended Abstract | iv |
| Índice Geral | vi |
| Índice de Figuras | viii |
| Índice de Quadros | x |
| 1. Objectivos | 1 |
| 2. Revisão bibliográfica | 2 |
| 2.1. A planta do espinafre..... | 2 |
| 2.2. Metais Pesados | 5 |
| 2.2.1. Relação entre os metais pesados e os seres vivos | 5 |
| 2.2.2. Cádmio | 11 |
| 2.3. Stresse Oxidativo | 16 |
| 2.3.1. Produção de ROS..... | 16 |
| 2.3.2. Mecanismos de remoção das ROS..... | 18 |
| 2.3.3. Evitar a produção de ROS..... | 19 |
| 2.3.4. O papel duplo das ROS..... | 20 |
| 2.3.5. Modificação de PUFA's | 21 |
| 3. Metodologia | 22 |
| 3.1. Amostragem | 22 |
| 3.1.2. Aplicação de cádmio | 24 |
| 3.1.3. Recolha de amostras..... | 25 |
| 3.2. Determinações Analíticas..... | 27 |
| 3.2.1. Teor de matéria seca..... | 27 |
| 3.2.2. Determinação do conteúdo mineral | 28 |
| 3.2.3. Determinação analítica do teor de clorofilas | 28 |
| 3.2.4. Determinação da peroxidação de lípidos | 29 |
| 3.2.5. Determinação do teor de peróxido de hidrogénio | 29 |
| 3.2.6. Determinação do teor de azoto nítrico total (<i>SKALAR Methods</i>)..... | 30 |
| 3.3. Tratamento estatístico | 31 |
| 4. Resultados e Discussão | 32 |
| 4.1. Efeito do cádmio nos parâmetros fisiológicos | 32 |
| 4.2. Avaliação do conteúdo mineral | 37 |
| 4.3. Efeito do cádmio no teor de clorofila | 43 |
| 4.3.1. Determinação do teor de clorofila por espectrofotometria | 43 |

| | |
|--|----|
| 4.3.2. Determinação do teor de clorofila com aparelho <i>Hansatech</i> | 44 |
| 4.4. Avaliação do efeito do cádmio na peroxidação de lípidos | 46 |
| 4.5. Avaliação do efeito do cádmio na formação de peróxido de hidrogénio | 48 |
| 4.5. Teor de azoto nítrico..... | 49 |
| 4.6. Correlações entre os parâmetros avaliados..... | 50 |
| 5. Conclusões..... | 56 |
| 6. Bibliografia | 58 |

Anexo

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Ilustração de <i>Spinacea oleracea</i> : (a) pé de flores femininas; (b) ramo com inflorescências masculinas; (c) porção da haste de plantas <i>femininas</i> ; (d) flor feminina; (e) flor feminina mostrando o ovário; (f) flor masculina; (g) fruto (Adaptada de Flora Ibérica,2011). | 2 |
| Figura 2 – Curvas de resposta típicas para micronutrientes (a) e elementos não essenciais (b) (Adaptado de Alloway & Ayres, 1993, retirado de Silva, 2006). | 5 |
| Figura 3 – Representação de possíveis mecanismos moleculares envolvidos na acumulação de metais de transição em plantas. (a) mobilização no solo e na planta, (b) absorção e entrada através da membrana, (c) transporte através do xilema, (d) transporte e armazenamento, (e) distribuição intracelular de metais. (Adaptada de Clemens <i>et al.</i> , 2002). | 9 |
| Figura 4 – Diagrama Eh/pH para o cádmio (Adaptada de Gomes, 1998). | 12 |
| Figura 5 – Ilustração das três etapas de produção: | 23 |
| Figura 6 – Esquema de amostras em hidroponia (caixas) com o respectivo código de identificação. | 24 |
| Figura 7 – Ilustração da etapa após recolha para amostras secas: | 25 |
| Figura 8 – Ilustração de etapa após recolha para amostras frescas: | 26 |
| Figura 9 – Ilustração da determinação não destrutiva de clorofila com <i>Hansatech</i> | 27 |
| Figura 10 – Equipamento SKALAR utilizado para determinar o azoto nítrico nas amostras de espinafre. | 30 |
| Figura 11 - Comprimentos médios da parte aérea (A) e raiz (B) de plantas em estudo, ao longo de 7 dias de ensaio e expostas a diferentes concentrações de cádmio. As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias de cada dia para cada modalidade de ensaio (T, 25 ou 50); $n=4$ | 32 |
| Figura 12 - Número médio de folhas e respectivo desvio padrão, de plantas de espinafre exposta a concentrações de 0, 25 e 50 μM de cádmio durante 7 dias; $n=4$ | 33 |
| Figura 13 - Teor de matéria seca de folhas (A) e raiz (B), em percentagem, ao longo de 7 dias e em plantas sujeitas às diferentes concentrações de cádmio (T, 25 μM , 50 μM). | 34 |
| Figura 14 – Variação média da biomassa total (g) de plantas de espinafre sem contaminação (T) e expostas a stresse com 25 e 50 μM de cádmio, durante 7 dias. As letras maiúsculas indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos ensaios, para cada dia; $n=4$ | 35 |
| Figura 15 – Teor de cádmio ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF) em folhas (A) e raiz (B) de plantas de espinafre expostas a stresse com 25 e 50 μM de cádmio, durante 7 dias de ensaio..... | 37 |

| | |
|--|-----|
| Figura 16 - Teor médio de clorofila expresso em $\mu\text{mol g}^{-1}$ de peso fresco (PF) de folha, para as amostras T e com contaminação de 25 e 50 μM de cádmio, durante 7 dias de exposição. As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias de cada dia para cada modalidade de ensaio (T, 25 ou 50), e as maiúsculas indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos ensaios, para cada dia. | 43 |
| Figura 17 – Teor médio de clorofila (unidades arbitrárias), para os ensaios com 0, 25 e 50 μM de cádmio durante sete dias. As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias de cada dia para cada modalidade de ensaio (T, 25 ou 50), e as maiúsculas indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos ensaios, para cada dia. | 44 |
| Figura 18 - Curva padrão que correlaciona o valor obtido pelo método <i>Hansatech</i> com o teor de clorofila medida no espectrofotómetro. $y = 0,1742x + 0,9887$, $R^2 = 0,9515$ | 45 |
| Figura 19 – Concentração média de malondialdeído (MDA) formado em folhas (A) e raiz (B), após a contaminação com 0, 25 e 50 μM de cádmio e ao longo de sete dias. As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias de cada dia para cada modalidade de ensaio (T, 25 ou 50), e as maiúsculas indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos ensaios, para cada dia; $n=3$ | 46 |
| Figura 20 - Concentração média de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) formado em folhas (A) e raiz (B), após a contaminação com 0, 25 e 50 μM de cádmio, e durante sete dias. As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias de cada dia para cada modalidade de ensaio (T, 25 ou 50), e as maiúsculas indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos ensaios, para cada dia; $n=3$ | 48 |
| Figura 21 - Concentração média de azoto nítrico (NO_3^-N) formado nas folhas de espinafre após a contaminação com 0, 25 e 50 μM de cádmio, durante sete dias. As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias de cada dia para cada modalidade de ensaio (T, 25 ou 50), e as maiúsculas indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos ensaios, para cada dia; $n=3$ | 49 |
| Figura 22 em anexo – Imagens de plantas de espinafres recolhidas ao longo do ensaio testemunha, a régua tem um comprimento de 50 cm. | I |
| Figura 23 em anexo – Imagens de plantas espinafres recolhidas ao longo do ensaio de 25 μM , a régua tem um comprimento de 50 cm. | II |
| Figura 24 em anexo – Imagens de plantas de espinafres recolhidas ao longo do ensaio de 50 μM , a régua tem um comprimento de 50 cm. | III |

ÍNDICE DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro I – Composição média de espinafre por 100 g de parte edível (INSA)..... | 3 |
| Quadro II - Percentagem de isótopos estáveis de cádmio..... | 11 |
| Quadro III – Teores máximos de cádmio admissíveis pela legislação em vigor..... | 13 |
| Quadro IV – Concentrações de cada constituinte da solução de Hoagland..... | 23 |
| Quadro V – Teor mineral de zinco, em $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco, determinado em folhas e raiz de plantas de <i>S. oleracea</i> sem contaminação (T) e exposta a concentrações de 25 e 50 μM de cádmio, durante 7 dias. | 38 |
| Quadro VI – Teor mineral de cobre, em $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco, determinado em folhas e raiz de plantas de <i>S. oleracea</i> sem contaminação (T) e exposta a concentrações de 25 e 50 μM de cádmio, durante 7 dias. | 39 |
| Quadro VII - Teor mineral de ferro, em $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco, determinado em folhas e raiz de plantas de <i>S. oleracea</i> sem contaminação (T) e exposta a concentrações de 25 e 50 μM de cádmio, durante 7 dias. | 39 |
| Quadro VIII - Teor mineral de manganês, em $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco, determinado em folhas e raiz de plantas de <i>S. oleracea</i> sem contaminação (T) e exposta a concentrações de 25 e 50 μM de cádmio, durante 7 dias..... | 40 |
| Quadro IX - Teor mineral de cálcio, em $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco, determinado em folhas e raiz de plantas de <i>S. oleracea</i> sem contaminação (T) e exposta a concentrações de 25 e 50 μM de cádmio, durante 7 dias. | 41 |
| Quadro X - Teor mineral de magnésio, em $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco, determinado em folhas e raiz de plantas de <i>S. oleracea</i> sem contaminação (T) e exposta a concentrações de 25 e 50 μM de cádmio, durante 7 dias..... | 41 |
| Quadro XI - Correlações entre os parâmetros analisados para a Testemunha..... | 53 |
| Quadro XII - Correlações entre os parâmetros analisados para o ensaio com contaminação de 25 μM de cádmio. | 54 |
| Quadro XIII - Correlações entre os parâmetros analisados para o ensaio com contaminação de 50 μM de cádmio. | 55 |

LISTA DE ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$ – Singleto de oxigénio

AOXs – Oxidases alternativas

APX – Ascorbato-peroxidase

ASC – Ascorbato

CAT – Catalase

DL₅₀ – Dose letal para 50 % da população

DNA – Deoxiribonucleic Acid; Ácido desoxirribonucleico

DP – Desvio Padrão

EAA – Espectrofotómetro de absorção atómica

Eh – Potencial Redox

GPX – Glutathione-peroxidase

GSH – Glutathione

GSSG – Glutathione oxidada

HNE – 4-hidroxi-2-nonenal

HO \cdot – Radical hidróxilo

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*; União Internacional de Química Pura e Aplicada

MDA - Malondialdeído

MS – Massa seca

Nramp – *Natural resistance associated macrophage protein*; Proteínas associadas à resistência natural de macrófagos

O $_2\cdot^-$ – Radical superóxido

OMS – Organização Mundial de Saúde

PF – Peso fresco

PS – Peso seco

PUFA – *Polyunsaturated fatty acids*; Ácidos gordos polinsaturados

RNA – Ribonucleic Acid; Ácido ribonucleico

ROS – *Reactive oxygen species*; Espécies reativas de oxigénio

SOD – Superóxido-dismutase

T – Testemunha

TBA – Ácido tiobarbiturico

TCA – ácido ticloroacético

FW – *Fresh Weight*; Peso fresco

1. OBJECTIVOS

A contaminação de produtos hortícolas com metais pesados, tóxicos para o homem, surge principalmente devido à contaminação de solos ou de água de rega, sendo uma preocupação crescente pois começa a tomar dimensões difíceis de controlar. As contaminações ocorrem com mais frequência em hortas urbanas, por surgirem perto das fontes emissoras desses poluentes (tráfego automóvel e alguns tipos de indústria) sendo que, hortas mais distantes destas fontes também possam ser afectadas pela contaminação do ciclo da água e por arrastamento, dissipação ou lixiviação de contaminantes por todo o ambiente.

Face a esta preocupação os investigadores tentam compreender o efeito destes metais no crescimento de várias espécies vegetais, e averiguar se a exposição de plantas alimentares a meios contaminados pode resultar na acumulação do Cd na parte edível, e consequentemente causar risco para o Homem pela sua utilização na alimentação. De entre os produtos hortícolas destaca-se o espinafre, como um dos vegetais mais consumidos, em todo o mundo (Nisha *et al.*, 2004). Este apresenta um elevado teor nutritivo, sendo rico em vitaminas e minerais, e sendo também fácil de preparar, podendo ser consumido em fresco ou processado (lata, congelado, sopa, esparregado, etc.) (Nishira *et al.*, 2001; Nisha *et al.*, 2004).

Neste contexto a compreensão do efeito do cádmio, como metal pesado e tóxico para o ser humano, torna-se relevante numa espécie vegetal vastamente consumida em Portugal, como o espinafre (*Spinacea oleracea*).

Neste trabalho foram produzidas plantas de espinafre em condições estritamente controladas e que simulam meios contaminados pelo Cd, verificando de que forma se manifesta o efeito tóxico deste metal no seu desenvolvimento. Foram avaliados os efeitos visíveis da toxicidade do Cd no teor de clorofila, no comprimento, na biomassa total e no número de folhas, já que constituem parâmetros que podem afectar o valor comercial da cultura. Foi também avaliado o teor de azoto nítrico nas folhas, o conteúdo em Cd nas diferentes partes da planta, bem como a influência do Cd no conteúdo em Zn, Cu, Mn, Fe, Ca e o Mg. Foram ainda determinados os teores de MDA e H₂O₂ formado, no sentido de avaliar a acumulação de ROS e a ocorrência de danos oxidativos que possam explicar os efeitos visíveis verificados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A planta do espinafre

O espinafre (*Spinacea oleracea* L.) pertence à família das Quenopodiáceas e ao género *Spinacea*, incluindo três a quatro espécies herbáceas originárias do sudoeste asiático (Almeida, 2006).

A *Spinacea oleracea* L. (figura 1) é uma planta anual, dioica e apresenta polinização anemófila (Almeida, 2006; Flora Ibérica, 2011).

Esta apresenta um sistema radicular aprumado, pouco ramificado e superficial. As folhas dispostas em roseta são pecioladas e têm o limbo de forma ovada, alongada ou pontiaguda. Nas folhas completamente expandidas o comprimento dos pecíolos é semelhante ao do limbo, mas diminui progressivamente das folhas mais velhas para as mais jovens. A superfície do limbo pode ser lisa ou apresentar rugosidades bolbosas semelhantes às da couve-lombarda. O fruto desta planta é um utrículo, seco e indeiscente, e monospermico, sendo apenas utilizado como semente: lisas e redondas ou espinhosas e irregulares, menos utilizadas actualmente (Almeida, 2006; Flora ibérica, 2011). A germinação óptima destas sementes ocorre em cerca de 7 dias aos 20 °C, (Almeida, 2006).



Figura 1 - Ilustração de *Spinacea oleracea*: (a) pé de flores femininas; (b) ramo com inflorescências masculinas; (c) porção da haste de plantas femininas; (d) flor feminina; (e) flor feminina mostrando o ovário; (f) flor masculina; (g) fruto (Adaptada de Flora Ibérica, 2011).

O desenvolvimento do espinafre considera-se em duas fases: a fase roseta e a fase reprodutiva. A primeira fase ocorre após o estado de plântula, onde o espinafre adquire uma forma de roseta, com as folhas inseridas num caule muito curto. A fase reprodutiva ocorre em condições específicas, tais como temperaturas superiores a 15 °C e um fotoperíodo de 14 h, para a maior parte das cultivares. Esta fase é caracterizada pelo aparecimento de inflorescências. Na fase de roseta a planta atinge uma altura de 15 a 25 cm, mas a haste floral pode atingir os 80 cm (Almeida 2006).

O espinafre adapta-se melhor a solos frescos e húmidos, com disponibilidade de água no solo constante. A alternância de períodos de abundância e défice de água favorece o espigamento. Pelo facto do sistema radicular do espinafre ser superficial explora um volume reduzido do solo, exigindo por isso regas frequentes, sendo a rega por aspersão a mais adequada para esta cultura (Almeida, 2006; Flora Ibérica, 2011).

O espinafre é um produto vegetal valorizado pelo seu elevado teor vitamínico, especialmente em ácido ascórbico, α -tocoferol, carotenos e vitamina A (quadro I). É também conhecido pelo seu considerável teor de ferro, embora este não seja todo assimilável pelo Homem, e de cálcio (Silva, 2006).

Quadro I – Composição média de espinafre por 100 g de parte edível (INSA).

| | | |
|--------------------------------|----------------------------|---------|
| Energia | | 22 kcal |
| | | 90 kJ |
| Macro-constituintes (g) | H ₂ O | 91,8 |
| | Proteína | 2,6 |
| | Lípidos Totais | 0,9 |
| | HC Totais disponíveis | 0,8 |
| | Fibra alimentar | 2,6 |
| Vitaminas (mg) | A (equivalente ao retinol) | 0,550 |
| | Caroteno | 3,3 |
| | α - tocoferol | 1,7 |
| | Tiamina | 0,070 |
| | Riboflavina | 0,18 |
| | Niacina | 0,4 |
| | B | 0,17 |
| | C | 35 |
| Minerais (mg) | Sódio (Na) | 173 |
| | Potássio (K) | 471 |
| | Cálcio (Ca) | 104 |
| | Fósforo (P) | 45 |
| | Magnésio (Mg) | 54 |
| | Ferro (Fe) | 2,4 |
| | Zinco (Zn) | 0,9 |

Contudo esta planta acumula ácido oxálico, um composto antinutricional que pode reduzir a biodisponibilidade de alguns minerais (Fe, Mg e Ca). Quando consumido em excesso este composto

pode provocar pedra nos rins por formação de outros compostos como, oxalato de cálcio e oxalato de ferro (Almeida, 2006; Silva, 2006).

Além desses compostos, os espinafres são, tal como outros vegetais de folha, acumuladores de azoto na forma nítrica que pode ser reduzido a nitritos e originar nitrosaminas que são compostos tóxicos e carcinogénicos. Os nitritos podem também causar meta-hemoglobinemia em bebés, por oxidarem o Fe^{2+} (ferro ferroso) da hemoglobina a Fe^{3+} (ferro férrico), transformando-a em meta-hemoglobina incapaz de transportar oxigénio no sangue (Shokarzadeh *et al.*, 2007).

O espinafre, introduzido na Península Ibérica no século XI pelos árabes, é hoje apresentado no mercado em fresco ou processado, sob a forma de congelados ou enlatados (Silva, 2006).

2.2. Metais Pesados

A definição de metal pesado é muito variável. As definições baseiam-se em vários parâmetros como: a densidade dos elementos, a massa atômica, o número atômico, a toxicidade e outros parâmetros químicos.

Alguns metais, considerados pesados, são também descritos como micronutrientes essenciais (Cu, Fe, Mn, Mo, Zn, Ni, B), outros podem estar presentes em plantas mas sem qualquer função específica conhecida, sendo denominados elementos vestigiais não essenciais.

Os metais pesados ocorrem naturalmente, como constituintes de rochas, existindo um fundo geoquímico destes no solo, na água e nos seres vivos. Deste modo, entende-se que a poluição só ocorre, quando a concentração destes elementos num dado meio é largamente superior aos níveis básicos já existentes (Gonçalves, 2000).

2.2.1. Relação entre os metais pesados e os seres vivos

Tal como descrito anteriormente, também podem estar incluídos na designação de metais pesados alguns micronutrientes essenciais, mas também elementos não essenciais. Os elementos essenciais, quando atingem uma determinada concentração, podem causar problemas de toxicidade, enquanto que abaixo das concentrações adequadas causam deficiência e podem influenciar negativamente o metabolismo dos organismos vivos. Os elementos não essenciais não causam deficiência como os micronutrientes, e acima de determinados limites de concentração causam problemas de toxicidade (figura 2).

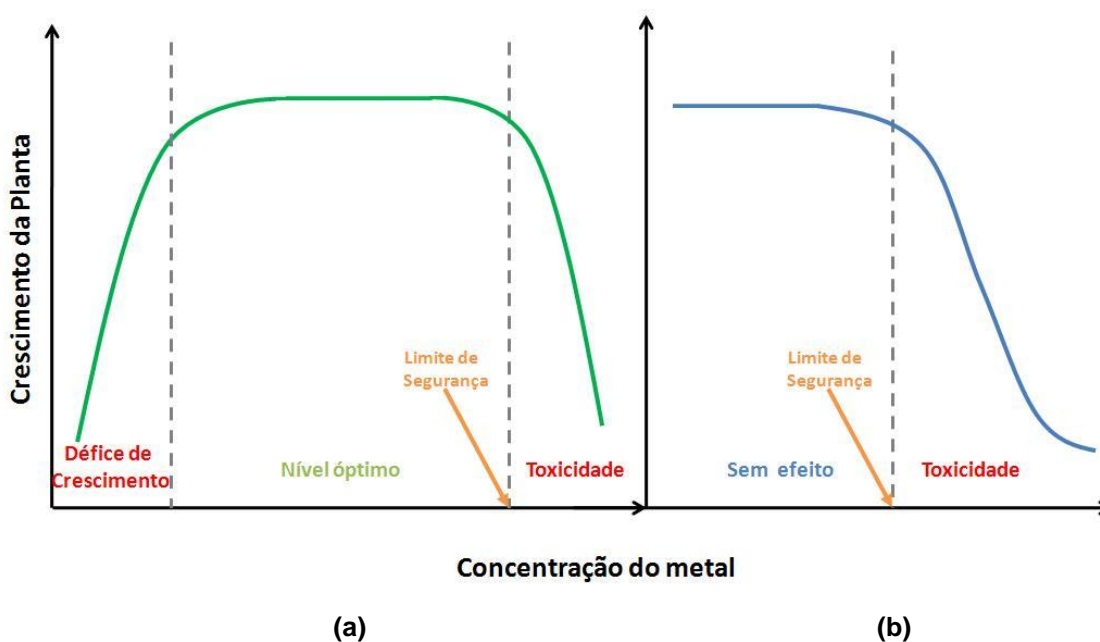


Figura 2 – Curvas de resposta típicas para micronutrientes (a) e elementos não essenciais (b) (Adaptado de Alloway & Ayres, 1993, retirado de Silva, 2006).

2.2.1.1. Biodisponibilidade, bioacumulação e toxicidade para o Homem

A biodisponibilidade refere-se à fracção disponível desse elemento ou substância que se encontra numa forma capaz de ser absorvida por um organismo, considerando uma determinada via específica de exposição (Varenes, 2003). No caso das plantas, a principal via de absorção dos metais é através da solução do solo, pelo que a biodisponibilidade está dependente das formas em que esses metais se encontram no solo.

A biodisponibilidade de metais pesados para plantas, é variável e depende das características do solo, designadamente das propriedades e características químicas, como o pH, a matéria orgânica disponível, a capacidade de troca catiónica, a força iónica, os óxidos de ferro e manganês, o potencial redox, as texturas, o teor de argila e a flora microbiana. Por exemplo, apenas uma pequena fracção do cobre total presente no solo se encontra biodisponível para as plantas, na forma de Cu^{2+} , uma vez que na forma iónica este se liga à matéria orgânica. Em geral, a biodisponibilidade diminui em solos neutros ou alcalinos, por precipitação, mas este processo pode ser reversível (Silva, 2006).

Os metais podem existir em diferentes formas químicas: solúvel na solução do solo (a única directamente disponível para absorção pelas plantas), em formas precipitadas, em formas adsorvidas (ex. em argila, matéria orgânica) ou em formas existentes na matriz dos minerais do solo (Reichman, 2002).

As diferentes fracções do metal no solo encontram-se em equilíbrio dinâmico, e a sua proporção relativa depende das características do meio envolvente, já referenciadas (Martins & Mourato, 2009).

Tendo em conta a biodisponibilidade dos metais foi proposto um modelo que divide as plantas em 3 grupos: *Acumuladoras ou Hiperacumuladoras*, as quais acumulam metais pesados de solos com níveis altos ou baixos; *Indicadoras*, nas quais a concentração no tecido vegetal reflecte a concentração do solo, existindo uma relação linear entre as duas; e *Exclusoras*, apresentam mecanismos específicos para regular a biodisponibilidade dos metais, por interferirem neste equilíbrio, através de mecanismos externos que actuam na restrição da absorção do metal a partir do solo (Silva, 2006; Martins & Mourato, 2009).

A toxicidade é um parâmetro complexo, uma vez que depende da espécie receptora e da especiação do elemento, nas condições de interacção com os organismos. Um elemento pode ser fitotóxico para determinadas plantas e não apresentar toxicidade significativa para o homem e vice-versa, acumulando-se na planta e podendo propagar-se na cadeia trófica e consequentemente induzir efeitos tóxicos no homem e outros animais (Silva, 2006). Os metais tóxicos apenas causam fitotoxicidade quando estão biodisponíveis em níveis elevados. O cádmio (Cd) apresenta um elevado potencial para bioacumulação, devido à sua semelhança com elementos como o zinco, cálcio, magnésio, potássio.

2.2.1.2. Mecanismos de acumulação de metais pesados de transição em plantas

O conceito de fitorremediação provocou um considerável interesse na acumulação de metais pela planta. O uso da acumulação como meio de remoção de metais contaminantes do solo e água tem sido proposto com base em observações bem documentadas de várias espécies de plantas, que não só toleraram níveis tóxicos de certos metais no solo, mas ainda os acumulam na sua parte aérea (Clemens *et al.*, 2002).

Por existirem diferenças significativas na acumulação de Cd entre diferentes variedades de plantas, a identificação molecular dos mecanismos que conduzem este processo pode resultar no desenvolvimento de marcadores úteis, ou na obtenção de culturas com teor de metais tóxicos reduzido.

Uma característica comum a todas as formas de vida é a acumulação de alguns elementos presentes no ambiente e a rejeição de outros. As taxas de acumulação são necessariamente orientadas por necessidades fisiológicas ao invés da toxicidade. Oligoelementos como o cobre e o zinco representam, neste aspecto, um dilema para os organismos específicos. Os seus iões são essenciais para um grande número de processos metabólicos mas também podem ser potencialmente perigosos. Assim, o controlo apertado e a regulação da acumulação de metais essenciais a nível celular são vitais para o organismo.

Além disso, devido ao controlo imperfeito da acumulação, os organismos têm que lidar com a exposição a elementos indesejados. A falta de especificidade dos sistemas de captação e distribuição também leva à acumulação de metais como Cd, que é geralmente considerado não essencial. De um modo geral, a acumulação de um metal é dada em função da capacidade de captação deste e da existência de locais intracelulares de ligação ao mesmo. Num organismo multicelular, a situação é complicada pelas diferenças de tecidos e células específicos bem como pelo transporte intercelular.

A figura 3 ilustra os processos assumidos como interferentes nas taxas de acumulação de metais em plantas: mobilização e absorção do solo, compartimentação e remoção na raiz, a eficiência da entrada e transporte no xilema, distribuição entre o metal dissipado na parte aérea, a remoção e o armazenamento nas células da folha. A figura 3 (a) representa a mobilização de iões metálicos pela secreção de quelantes e pela acidificação da rizosfera. Por outro lado a figura 3 (b) demonstra a absorção de iões metálicos hidratados ou complexos de metal-quelato, mediada por vários sistemas de captação na membrana plasmática, na célula os metais são quelados e os metais em excesso são sequestrados pelo transporte para o vacúolo. Das raízes, os metais de transição são transportados para a parte aérea através do xilema tal como está representado na figura 3 (c). Presumivelmente, a maior parte dos metais atinge o xilema via simplasto da raiz, a passagem apoplástica pode ocorrer na ponta da raiz. Dentro do xilema, os metais estão presentes como iões hidratados ou como complexos de metal-quelato. Depois de atingir o apoplasto da folha, figura 3 (d), os metais são diferencialmente capturados por diferentes tipos de células da folha e movem-se célula a célula através de plasmodesmos. O armazenamento parece ocorrer preferencialmente nos tricomas. Por fim a figura 3

(e) ilustra a absorção nas células da folha é de novo catalisada por vários transportadores. A distribuição intracelular de metais de transição essenciais é mediada por *metalochaperones* específicas e transportadores localizados em endomembranas.

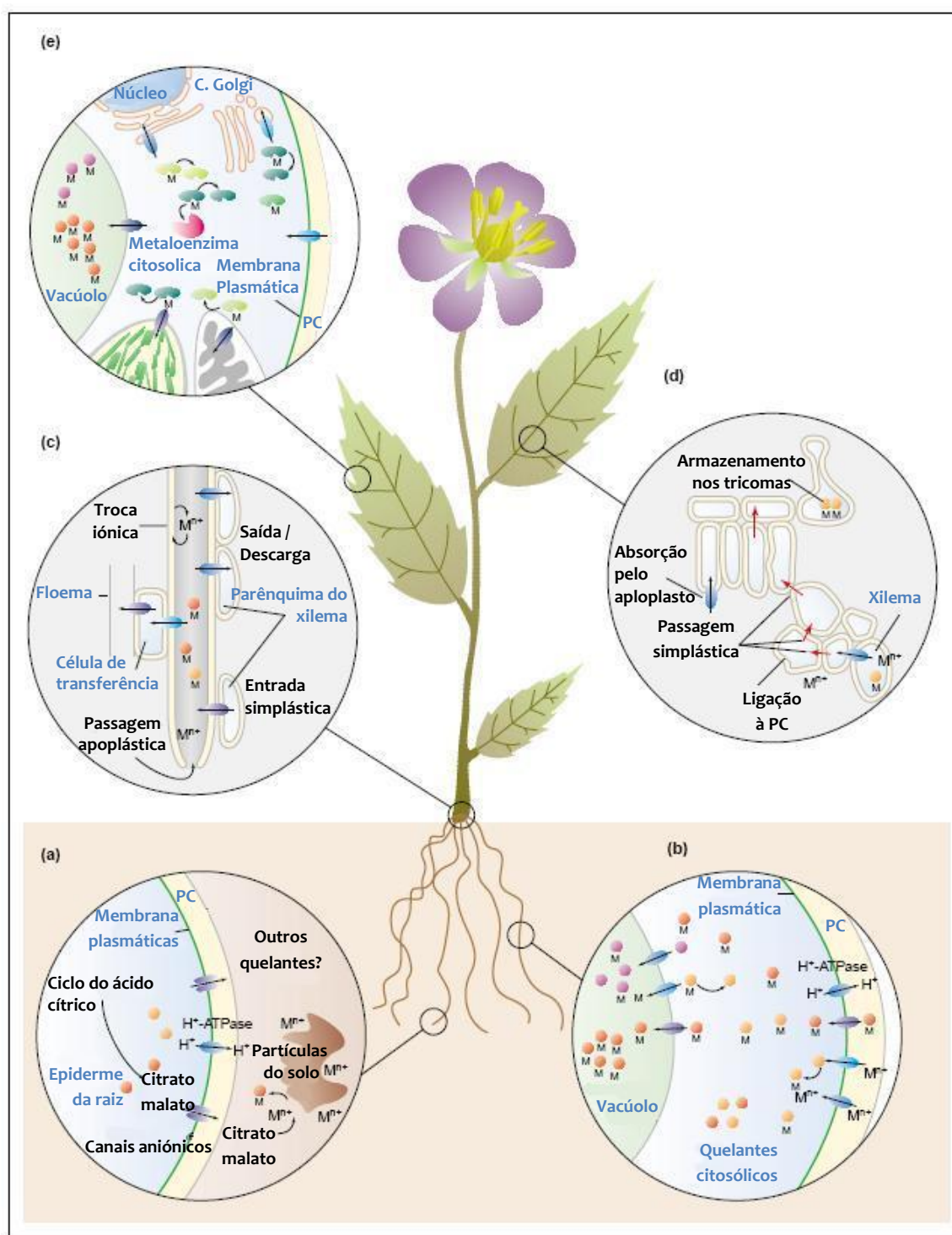


Figura 3 – Representação de possíveis mecanismos moleculares envolvidos na acumulação de metais de transição em plantas. (a) mobilização no solo e na planta, (b) absorção e entrada através da membrana, (c) transporte através do xilema, (d) transporte e armazenamento, (e) distribuição intracelular de metais. (Adaptada de Clemens *et al.*, 2002).

PC - parede celular; M - metal;

Todos os níveis de concentração e afinidade de moléculas quelantes, bem como a presença e selectividade das actividades de transporte, afectam as taxas de acumulação de metais. A absorção de iões metálicos é provável que ocorra através de transportadores secundários, tais como canais proteicos e/ou proteínas transportadoras acopladas a H^+ (Clemens *et al.*, 2002).

Diversos transportadores catiónicos têm sido identificados nos últimos anos com o uso de técnicas moleculares, em grande parte devido à complementação de mutantes *Saccharomyces cerevisiae*. A maioria dos transportadores que podem estar envolvidos na captação de micronutrientes pertence às famílias de ZIP (ZRT, IRT-como a proteína) e de Nramp (natural resistance associated macrophage protein - proteínas naturais associadas à resistência a macrófagos) (Clemens *et al.*, 2002).

Outros estudos em leveduras, tornam evidente que a maioria dos transportadores catiónicos apresentam uma ampla gama de substratos, permitindo que mesmo os metais não essenciais como Cd entrem nas células (Clemens, 2006). A expressão da IRT1, por exemplo, capta Fe^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} e em condições de captura deficiente, em *S. cerevisiae* demonstrou causar hipersensibilidade ao Cd^{2+} (Clemens *et al.*, 2002). A superexpressão da IRT1 em *A. Thaliana* demonstrou acumular mais Zn^{2+} e Cd^{2+} na raiz sob condições de falta de Fe (Clemens, 2006). Este tipo de trabalhos fornece, deste modo, fortes evidências de que a IRT1 pode ser responsável pelo influxo de Cd^{2+} em células de raiz.

No trigo o transportador LCT1 de Ca^{2+} , foi demonstrado como mediador da captação de iões Na^+ Cd^{2+} em levedura, contudo dados sobre este transportador em plantas ainda são desconhecidos (Clemens *et al.*, 2002; Clemens, 2006).

As proteínas Nramp em *S. cerevisiae* transportam Mn, Cu, Co e Cd. O trabalho inicial sobre AtNramp1, 3 e 4 mostrou que apresentam actividade de captação de Cd^{2+} quando expresso em *S. cerevisiae*. Além disso, a superexpressão, de AtNramp3 em *A. Thaliana* resultou em hipersensibilidade ao Cd^{2+} . Mais tarde, a AtNramp3 foi encontrada na membrana vacuolar estando relacionada com a mobilização de metais para o vacúolo (Adaptada de Clemens, 2006).

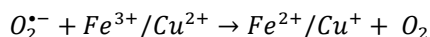
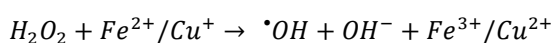
Com os resultados destes estudos torna-se evidente que o Cd^{2+} é absorvido nas células vegetais por canais de transporte de baixa especificidade de Fe^{2+} , Ca^{2+} e Zn^{2+} .

Existe contudo, uma excepção já determinada em estudos de captação Cd^{2+} em plantas hiperacumuladoras de Cd, *T. caerulescens*. Nesta espécie verificou-se que a captação de Cd^{2+} em raízes do ecótipo Ganges não foi inibida por concentrações equimolares de Zn^{2+} , o que pode indicar a existência de um sistema específico de captação de Cd^{2+} nesta planta particular (Clemens, 2006).

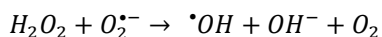
2.2.1.3. Iões metálicos e o metabolismo secundário

A exposição de plantas a alguns iões metálicos altera o balanço do metabolismo de radicais livres, levando à acumulação de H_2O_2 . Por sua vez o H_2O_2 , na presença de metais de transição redox activos como o Cu^+ e o Fe^{2+} , é convertido a radicais hidroxilo (HO^\bullet), numa reacção catalisada pelo metal, via reacções de Fenton. Os iões metálicos oxidados passam por uma re-redução, numa reacção subsequente com os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Outro mecanismo, independente da presença do metal, que também origina radicais HO^\bullet , directamente de H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$, designa-se reacção de Haber-Weiss, representada de seguida (Mithofer *et al.*, 2004):

Reacção de Fenton:



Reacção de Haber-Weiss:



Como o cádmio não é um metal de transição, não participa nas reacções de Fenton, o que pressupõe a existência de um mecanismo diferente que causa a formação de ROS. Uma possível explicação é que os iões Cd^{2+} inibem a actividade antioxidante das enzimas o que por conseguinte, implica uma acumulação natural de ROS (Mithofer *et al.*, 2004). Outra explicação é o Cd substituir outros metais como o Fe em compostos celulares (Cuyper *et al.* 2010), causando perda de funcionalidade de algumas moléculas, como é o caso da inactivação de enzimas. O Fe, por sua vez ficará disponível para causar reacções de Fenton e induzir aumento de ROS.

2.2.2. Cádmio

O cádmio é um metal de transição do grupo 12 (IUPAC) e do segundo período da tabela periódica consistindo numa mistura de oito isótopos estáveis (quadro II) e 34 isótopos instáveis (Mendes & Oliveira, 2004). Este metal é considerado pesado não essencial, apresenta uma densidade de $8,6 \text{ g cm}^{-3}$, é tóxico em pequenas concentrações e é sólido à temperatura ambiente.

Quadro II - Percentagem de isótopos estáveis de cádmio

| ^{106}Cd | ^{108}Cd | ^{110}Cd | ^{111}Cd | ^{112}Cd | ^{113}Cd | ^{114}Cd | ^{116}Cd |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1,22 | 0,88 | 12,39 | 12,75 | 24,07 | 12,26 | 24,85 | 7,58 |

Adaptado de Ferreira, 1979; retirado de Gomes, 1998.

2.2.2.1. Origem, teores e formas de cádmio no solo

O cádmio constitui um elemento pouco frequente na crosta terrestre, encontrando-se sob a forma vestigial na maior parte dos solos e uniformemente distribuído nas rochas mais abundantes da crosta terrestre (Mendes & Oliveira, 2004).

A distribuição de cádmio pelos compartimentos da ecosfera é de $2,36 \times 10^5$ kg na crosta terrestre, $1,32 \times 10^{11}$ Kg nos oceanos e $9,20 \times 10^7$ kg em plantas. Em águas não poluídas o teor de cádmio é, normalmente, inferior a $1 \mu\text{g L}^{-1}$, contudo este teor pode atingir os $10 \mu\text{g L}^{-1}$ em situações de contaminações acentuadas (Mendes & Oliveira, 2004).

Do ponto de vista geológico, este encontra-se normalmente associado a minérios de zinco (esfalerite, smithsonite, biotite e anfíbolos) e de chumbo. O principal minério de cádmio é a greenockita, encontrando-se sob a forma de sulfureto (CdS). Este metal apresenta-se também, na natureza, sob a forma de octavites (CdCO_3) e monteporites (CdO) (Mendes & Oliveira, 2004).

Do ponto de vista químico apresenta um aspecto bastante importante, relativo ao seu comportamento em solução aquosa. O cádmio metálico apresenta baixa solubilidade, mas alguns dos seus sais nomeadamente cloretos, nitratos e sulfatos é mais solúvel (Mendes & Oliveira, 2004).

Na figura 4 apresenta-se um diagrama que relaciona o potencial redox do cádmio com o pH da solução. Da análise da figura conclui-se que em soluções de pH inferior a 8 o cádmio apresenta-se na forma iónica, e para pH superior a 8 são frequentes os carbonatos (CdCO_3) e hidróxidos de cádmio, que são mais solúveis (Mendes & Oliveira, 2004; Gomes, 1998). A espécie CdS controla a concentração de cádmio para ambientes fortemente redutores (Gomes, 1998).

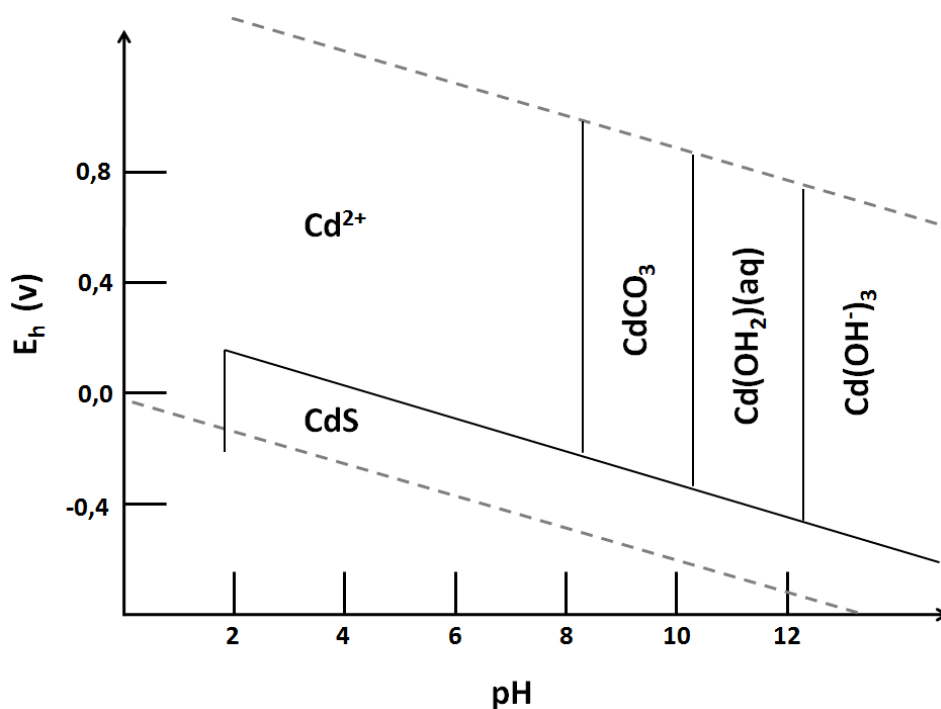


Figura 4 – Diagrama Eh/pH para o cádmio (Adaptada de Gomes, 1998).

De acordo com di Toppi & Gabbrielli (1999), a assimilação de cádmio pelas plantas depende da sua concentração no solo e da sua biodisponibilidade, não só modelada pelo pH do meio e potencial redox, descrito anteriormente, mas também modulada pelo teor de matéria orgânica, temperatura e concentração de outros elementos (Baptista, 2009).

O cádmio, apesar de relativamente móvel no solo, sob a forma de ião Cd^{2+} , compete com os iões de Ca^{2+} e K^{+} à superfície de colóides de argila e colóides orgânicos. Deste modo, a disponibilidade de certos nutrientes bem como os valores do pH, interferem na biodisponibilidade e consequentemente na absorção de Cd (Santos, 1991; Gomes, 1998).

As fontes de poluição com cádmio mais importantes são as ligadas à combustão de carvão, às metalurgias de zinco, cobre e ferro, aos tratamentos de superfície e à agricultura. Encontram-se igualmente situações de poluição urbana devidas ao tráfego automóvel, de fabrico de ligas, de soldas e baterias, de uso como estabilizante de materiais plásticos, pigmento (CdS , CdSe), etc. (Mendes & Oliveira, 2004).

Este elemento não é um elemento essencial, mas sim tóxico mesmo em pequenas quantidades para animais e para o Homem, quanto às plantas toleram níveis mais elevados deste metal (Mengel & Kirkby, 2001).

A legislação Portuguesa em vigor referente aos teores de cádmio em águas de consumo humano e rega, em solos e lamas de uso agrícola e em produtos hortícolas de folha está presente no quadro III.

Quadro III – Teores máximos de cádmio admissíveis pela legislação em vigor.

| Teor de cádmio | | | Bibliografia |
|---|---|-----|------------------------------|
| Águas de consumo humano | $5 \mu\text{g L}^{-1}$ | VMA | Decreto-Lei n.º 236/98 |
| | | VI | Directiva 98/83/CE* |
| | | | OMS |
| Águas de rega | $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ | VMA | Decreto-Lei n.º 236/98 |
| Solos | $1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS (pH} \leq 5,5)$ | LM | Decreto-Lei n.º 118/2006 |
| | $3 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS (} 5,5 < \text{pH} \leq 7)$ | LM | |
| | $4 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS (pH} \geq 7)$ | LM | |
| Lamas para agricultura | $20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}$ | LM | Decreto-Lei n.º 118/2006 |
| Produtos hortícolas de folha e plantas aromáticas em fresco | $0,20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ PF}$ | LM | Regulamento(CE) n.º 629/2008 |

*alterada pelo DL 306/2007, sem alteração do valor paramétrico deste poluente

VMA – valor máximo admissível

CMA- concentração máxima admissível

VI – valor indicativo

LM – limite/teor máximo

2.2.2.2. Absorção de cádmio pelas Plantas

A absorção de cádmio pelas plantas pode ocorrer tanto a nível radicular como foliar.

O cádmio nas plantas é muito móvel, tornando-o perigoso uma vez que ao ser absorvido pelas raízes facilmente é translocado para outras partes da planta, afectando os seus processos metabólicos ou acumulando-se nos tecidos (figura 3). Por outro lado a absorção foliar dá-se a partir do cádmio presente na atmosfera, dependendo das emissões industriais e urbanas, da superfície foliar, velocidade do vento e precipitação da zona.

Plantas como cenouras, alface, espinafre e trigo são acumuladoras de cádmio, sendo bastante tolerantes a altas concentrações deste metal no solo, não apresentando sintomas de toxicidade (Gomes, 1998; Mendes & Oliveira, 2004). Perante isto, este facto torna-se um ponto-chave para os investigadores, visto que através deste tipo de plantas podem existir efeitos de bioampliação ao longo da cadeia alimentar (Gomes, 1998).

O cádmio pode substituir, nos tecidos o Ca e o Mg, sob a forma iónica, devido à semelhança dos respectivos raios atómicos. Além disso sabe-se que a presença de Zn bem como Ca (relacionado com a permeabilidade da membrana celular, transporte selectivo de iões) pode apresentar um efeito protector em relação a este metal pesado (Mendes & Oliveira, 2004). Deste modo a deficiência destes iões ocasiona uma maior absorção de cádmio pelas plantas (Gomes, 1998).

Este metal provoca efeitos de fitotoxicidade, que se refletem na integridade das membranas plasmáticas. Pensa-se que por consequência, pode existir a inibição de incorporação de nitrato e potássio e a diminuição do processo de transpiração (inibição da abertura dos estomas), sendo o teor de NO_3^- e a sua assimilação inibida em plantas jovens (Gomes, 1998).

Diversos estudos sugerem que o Cd pode produzir stress oxidativo tanto pela indução de produção de ROS tanto por diminuir a capacidade antioxidante, enzimática e não enzimática (Sandalio *et al.*, 2001). Maksymiec & Krupa (2006) demonstraram que Cd a 100 μM estimula a produção de radicais de oxigénio, como H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$. Contudo este metal não produz directamente os radicais hidroxilo pelas reações de Fenton ou Harber-Weiss. Ele interfere em várias funções celulares por formar complexos com grupos laterais de proteínas, lípidos e nucleótidos, levando à inibição da expressão génica e de actividades metabólicas, com um consequentemente aumento da produção de ROS e indução de stresse oxidativo (di Toppi & Gabbrielli, 1999; Baptista, 2009).

O Cd apresenta também um efeito inibitório na fotossíntese envolvendo a degradação da clorofila, diminuição do metabolismo de carbono e alterações no metabolismo do ferro. Deste modo alguns dos sintomas de fitotoxicidade de Cd em plantas são o aparecimento de cloroses e necroses nas folhas, seguidas pela abscisão foliar. Vários autores demonstraram ainda que a absorção de Cd pelas plantas pode levar à inibição do seu crescimento ou mesmo causar a morte; contudo os mecanismos envolvidos são ainda pouco compreendidos (Sandalio *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2007).

Além de tudo isso, a acumulação de Cd interfere na assimilação, transporte e utilização de diversos elementos como Ca, Mg, P e K, bem como de água (di Toppi & Gabbrielli, 1999).

2.2.2.3. O cádmio e a Segurança Alimentar

O Homem está exposto ao Cd pelo consumo de alimentos contaminados, por inalação directa e através do fumo do tabaco.

Para o homem a dose letal média (DL_{50}) face ao cádmio é de $0,027 \text{ g.kg}^{-1}$ de peso vivo (Mendes & Oliveira, 2004). A sua ingestão provoca reacções de toxicidade, que se traduzem na repressão do crescimento e diminuição da digestão de proteínas e lípidos. O cádmio substitui o zinco e liga-se irreversivelmente a proteínas originando carcinomas e dermatoses. Este pode ainda provocar, problemas de hipertensão e acidentes cardiovasculares verificando-se um processo de acumulação, nos rins, fígado e órgãos reprodutivos. As intoxicações crónicas traduzem-se em problemas gastrointestinais, doença crónica pulmonar obstrutiva, doença renal crónica tubular, distúrbios esqueléticos e nervosos e em problemas de hipertensão arterial (Casarett & Doull's, 2001; Mendes & Oliveira, 2004).

As principais fontes de contaminação dos alimentos por cádmio são a água residual das indústrias e os fertilizantes (Belitz & Grosch, 2004). Os vegetais podem aparecer com níveis de Cd elevados por crescerem em meios contaminados, onde o Cd se encontra com elevada biodisponibilidade e/ou em plantas que tenham maior tendência para acumulação, principalmente na parte edível.

2.3. Stresse Oxidativo

Durante o seu ciclo de vida, as plantas tal como outros organismos vivos, estão sujeitas a diversas situações desfavoráveis que podem levar a alterações fisiológicas, afectando o seu desenvolvimento e consequentemente a sua produtividade. O conjunto de alterações fisiológicas que surgem em consequência da produção intracelular excessiva e/ou acumulação de espécies reactivas de oxigénio (reactive oxygen species, ROS¹) é denominado por stresse oxidativo (Vansgroveld *et al.*, 1994).

O stress oxidativo pode ser biótico (causado por outros seres vivos) ou abiótico (causado por um factor externo que não um ser vivo, como stresse mecânico, radiação ultravioleta, carência de nutrientes, seca, metais pesados, etc.), traduzindo-se no desencadear de uma resposta metabólica na planta.

Essa resposta metabólica baseia-se na activação de mecanismos específicos de eliminação do excesso de ROS no interior das células de forma a obter um controlo da sua acumulação, bem como a regulação da expressão genética para produção de metabolitos de sinalização (H₂O₂, glutathione reduzida e oxidada, ascorbato e desidroascorbato) (Martins & Mourato, 2009).

2.3.1. Produção de ROS

A produção de ROS, tais como superóxido (O₂•⁻), peróxido de hidrogénio (H₂O₂), radicais hidroxilo (HO•) e singlete de oxigénio (¹O₂), é um processo que ocorre sempre nos organismos aeróbios (Moller *et al.*, 2007). Estes resultam de processos celulares como a fotossíntese, fotorrespiração, oxidação dos lípidos e a respiração celular, sendo considerados como subprodutos inevitáveis deste tipo de metabolismo (Mittler, 2002; Apel & Hirt, 2004).

Deste modo nas células vegetais a maioria das ROS produzidas surge nos cloroplastos ou peroxissomas, existindo também uma menor produção por parte da mitocôndria (Navrot *et al.*, 2007). Sob condições fisiológicas estáveis, existe um equilíbrio entre a produção de ROS e a sua eliminação, sendo rigorosamente controlado deve manter estáveis os níveis intracelulares destes (Apel & Hirt, 2004).

Contudo por vezes este equilíbrio é perturbado por diversos factores adversos, levando ao aumento rápido do nível intracelular de ROS. Além das fontes de produção descritas, quando a planta está sob condições de stresse, estas espécies formam-se pelas NADPH-oxidases, amina-oxidases e pelas peroxidases na parede celular (Mittler, 2002).

Assim a produção normal de ROS nas células é baixa, apresentando concentrações de 240 µM.s⁻¹ O₂•⁻ e um nível estável de 0,5 µM de H₂O₂ nos cloroplastos; e após pressões que perturbem a

¹ Neste trabalho será utilizada a abreviatura ROS (resultante do inglês “reactive oxygen species”) para referir espécies reactivas de oxigénio, embora algumas referências bibliográficas utilizem a abreviatura ERO.

homeostase celular os níveis de ROS aumentam para valores de $240\text{-}720\ \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ $\text{O}_2^{\bullet-}$ e $5\text{-}15\ \mu\text{M}$ H_2O_2) (Mittler, 2002).

Os cloroplastos produzem $^1\text{O}_2$ no fotossistema II (PSII) e $\text{O}_2^{\bullet-}$ no fotossistema I (PSI) e PSII como subprodutos. Na mitocôndria existe a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ nos complexos I e III, também como subprodutos. É estimado um consumo de oxigénio na mitocôndria de 1-5% para a produção ROS. Os peroxissomos produzem $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 em várias reacções metabólicas chave. E, finalmente, a NADPH-oxidase na membrana plasmática produz $\text{O}_2^{\bullet-}$, que participa em diversos processos fisiológicos (Moller *et al.*, 2007).

O efeito nocivo das ROS é muito variável, dependendo da quantidade gerada de cada espécie, da sua reactividade e das moléculas em que actuam, do tempo de semi-vida, da distância que podem percorrer na célula e do compartimento celular em que são produzidos em maior quantidade. O peróxido de hidrogénio e o radical superóxido são espécies menos reactivas que se formam mesmo em condições metabólicas estáveis, enquanto que o radical hidroxilo e o singlete de oxigénio são espécies mais reactivas e que se formam geralmente em condições de stresse (Moller *et al.*, 2007). O radical hidroxilo (HO^{\bullet}) embora tenha um tempo de semi-vida curto é particularmente difícil de eliminar visto que não são conhecidas moléculas específicas que o consigam degradar, pelo que é mais vantajoso para a célula eliminar os seus precursores, como o superóxido (Moller *et al.*, 2007).

As ROS podem desencadear reacções de peroxidação de lípidos membranares insaturados (ácidos gordos polinsaturados, PUFA, polyunsaturated fatty acids), causando o aumento da permeabilidade das membranas e perda da compartimentação celular (Pinto *et al.*, 2009; Cuypers *et al.*, 2010). Além da peroxidação lipídica, pode ocorrer a oxidação proteica causando inibição enzimática ou outros danos na fracção proteica e danos ao nível do DNA e RNA, provocando senescência, diminuição do processo de fotossíntese e necrose das folhas (Scandalios, 2002). Em situações limite, devido ao aumento excessivo de produção de ROS pode ocorrer a morte celular programada. Assim, torna-se evidente a importância de um controlo rigoroso do nível de ROS em cada compartimento celular, para prevenir a sua toxicidade e ao mesmo tempo permitir que as ROS actuem como sinalizadores do metabolismo celular (Mittler, 2002; Apel & Hirt, 2004).

2.3.2. Mecanismos de remoção² das ROS

Os principais mecanismos de remoção de ROS nas plantas são os mecanismos enzimáticos, destacando a superóxido-dismutase (SOD), a ascorbato-peroxidase (APX), glutathione-peroxidase (GPX) e a catalase (CAT) (Mittler, 2002; Apel & Hirt, 2004). O equilíbrio entre estas enzimas ou entre a sua actividade nas células é crucial para determinar o nível estável de radicais superóxido e peróxido de hidrogénio. Este equilíbrio, juntamente com a remoção de iões metálicos é crucial para prevenir a formação do radical hidroxilo, altamente tóxico, através das reacções de Fenton ou Haber-Weiss (Mittler, 2002).

A SOD actua na primeira linha de defesa contra as ROS, eliminando o superóxido com a formação de peróxido de hidrogénio, em quase todos os compartimentos celulares. De seguida enzimas como a APX, GPX e CAT eliminam o peróxido de hidrogénio formado, evitando o seu efeito nocivo (Apel & Hirt, 2004).

A APX e CAT apresentam afinidades diferentes para o peróxido de hidrogénio (intervalo de μM e mM , respectivamente) sugerindo que têm funções celulares diferentes. Pensa-se que a APX pode ser responsável pela modulação estrita de ROS para sinalização enquanto que a CAT estará mais associada à remoção do excesso de ROS formados durante o stresse (Mittler, 2002).

A ocorrência do ciclo da glutathione-ascorbato em quase todos os compartimentos celulares estudados e a elevada afinidade da APX para o peróxido de hidrogénio, sugere que este ciclo desempenha um papel importante no controlo do nível de ROS nesses mesmos compartimentos. Por outro lado, a CAT apenas se encontra nos peroxissomas, que se multiplicam quando a célula está sob stresse. Esta enzima não necessita do fornecimento de redutores equivalentes para a sua função, podendo ser insensível ao estado redox das células e consequentemente a sua função não é afectada durante o stresse (Mittler, 2002).

Como mecanismos de defesa não enzimáticos destacam-se a glutathione (GSH) e o ácido ascórbico (ASC), bem como, embora com menos evidência, os flavonoides, tocoferol, alcalóides e carotenóides (Apel & Hirt, 2004).

Tanto a GSH como o ASC são encontrados em concentrações elevadas nos cloroplastos e outros compartimentos celulares, na ordem de 1–5 mM e 5–20 mM, respectivamente (Mittler, 2002). Quando GSH é oxidada pelas ROS forma a glutathione oxidada (GSSG), o ascorbato é oxidado a monodesidroascorbato e desidroascorbato, sendo regenerados (GSH e ASC) pelo ciclo glutathione-ascorbato (Apel & Hirt, 2004). A relação entre ASC, tal como GSH, reduzidos e oxidados é essencial para a defesa de ROS nas células.

Por outro lado, pouco se sabe sobre a defesa de ROS por parte dos flavonoides e carotenoides em plantas.

² A palavra remoção, ao longo do trabalho, aplica-se ao termo inglês *scavenging*

Todos os mecanismos descritos, são considerados como estratégias internas de resposta ao stresse, contudo existem mecanismos que actuam no controlo do *uptake* de metais pelas plantas. Estes mecanismos denominados por externos, actuam na restrição da absorção e do transporte do metal para dentro da planta.

Os mecanismos externos consistem num conjunto de factores como o aumento da produção e excreção de agentes de sequestração e acidificação da rizosfera, exclusão dos metais por absorção selectiva e retenção dos metais nas raízes, evitando a sua translocação para a parte aérea. Grande parte dos metais pode ficar retido no apoplasto e nas paredes celulares das raízes, em pectinas e em grupos com carga negativa de proteínas, pelo que os teores de metais na raiz são geralmente mais elevados que na parte aérea (Martins & Mourato, 2009).

2.3.3. Evitar a produção de ROS

Evitar a produção de ROS é tão importante como a activar os mecanismos de defesa dos mesmos. Evitar ou atenuar os efeitos de stresses abióticos sobre o metabolismo da planta permite reduzir o risco da produção de ROS.

Os mecanismos que podem reduzir a produção de ROS durante o stresse incluem:

- (1) adaptações anatómicas, tais como o movimento e encaracolar das folhas, o desenvolvimento da refracção da epiderme e formas de “esconder” os estomas em estruturas especializadas;
- (2) adaptações fisiológicas, como o metabolismo das plantas em C4 e das plantas CAM (metabolismo ácido das crassulaceas), nos cloroplastos, citosol e vacúolos;
- (3) mecanismos moleculares que reorganizam o aparelho fotossintético e os pigmentos antena de acordo com a qualidade e intensidade da luz, ou suprimem completamente a fotossíntese (Mittler, 2002).

Ao equilibrar a quantidade de energia de luz absorvida pela planta com a disponibilidade de dióxido de carbono (CO₂), este mecanismo pode representar uma tentativa de evitar a redução excessiva do aparelho fotossintético e a transferência de electrões para oxigénio, em vez de para a fixação de dióxido de carbono.

A produção de ROS também pode ser diminuída pela canalização alternativa de electrões na cadeia de transporte destes dos cloroplastos e mitocôndrias por um grupo de enzimas denominadas oxidases alternativas (AOXs). As AOXs podem desviar electrões que fluem através de cadeias de transporte de electrões e usá-los para reduzir o oxigénio a água. Assim, estas diminuem a produção de ROS através de dois mecanismos: impedem a redução de oxigénio ao radical superóxido e reduzem o nível global de oxigénio, que é o substrato da produção de ROS nos organelos celulares (Mittler, 2002).

2.3.4. O papel duplo das ROS

As plantas, tal como outros organismos fotossintéticos aeróbicos, surgiram e evoluíram na presença de oxigénio atmosférico e consequentemente desenvolveram vias metabólicas capazes de utilizar o grande potencial energético do oxigénio e também capazes limitar os efeitos colaterais deletérios deste oxidante e das suas moléculas activas derivadas, as ROS (Navrot *et al.*, 2007).

Por um lado, as plantas precisam de controlar os níveis destes oxidantes devido à sua natureza prejudicial, mas por outro lado, eles também usam as ROS como moléculas de sinalização, especialmente em resposta a várias tensões ou ameaças à integridade da planta, como ataques de organismos patogénicos, ou condições não ideais de crescimento (Navrot *et al.*, 2007).

Segundo Mittler *et al.* (2011) várias vantagens surgem quando se considera o uso de ROS como moléculas de sinalização. De entre essas vantagens distinguiu:

- A capacidade da célula para produzir e remover rapidamente diferentes formas de ROS simultaneamente, permitindo que ocorram mudanças rápidas e dinâmicas nestes níveis (provocada por simplesmente inclinar a balança entre a produção celular e as taxas de remoção).
- O controlo apertado sobre a localização sub-celular de sinais de ROS nas células. Isto significa que o aumento da produção de ROS pode ser limitado a determinados locais na célula, tornando o controlo espacial e acumulação de ROS altamente específicos.
- As ROS podem ser usadas como uma auto-propagação rápida de longa distância de sinais transferidos em toda a planta. Cada célula individual ao longo do caminho do sinal pode activar o seu mecanismo de produção de ROS de forma autónoma, carregando um sinal de ROS a longas distâncias.
- A existência de diferentes formas de ROS, com diferentes propriedades moleculares, faz destas, moléculas de sinalização versáteis. Por exemplo o radical superóxido é uma molécula carregada na maioria das condições fisiológicas e não pode ser transportada passivamente através das membranas. Contudo esta molécula pode ser facilmente transformada em peróxido de hidrogénio, que é passivamente transferido pelas membranas celulares. Ambas as moléculas podem mediar a peroxidação dos lípidos tornando as membranas solúveis.
- A estreita ligação das ROS com a homeostase celular e o metabolismo. Alterações na homeostase celular, bem como em condições fisiológicas que favoreçam a fotorrespiração levam à alteração do nível estável de ROS. Deste modo as ROS surgem também como bons sinalizadores de alterações no metabolismo celular.

2.3.5. Modificação de PUFAs

Os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) linoléico (18:2) e linolénico (18:3) são os principais ácidos gordos na membrana do tilacoide (galactolipídios) de plantas e de outras membranas (fosfolípidos). Os PUFAs são particularmente susceptíveis ao ataque do singlete de oxigénio e radical hidroxilo, dando origem a misturas complexas de hidroperóxidos lipídicos.

A extensa peroxidação dos PUFA diminui a fluidez da membrana, aumenta a permeabilidade, e provoca danos secundários às proteínas da membrana. Como resultado desta reacção são formados vários aldeídos como por exemplo, 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) e malondialdeído (MDA), bem como diversos outros produtos resultantes da alteração de ácidos gordos, tal como é referido por Moller *et al.* (2007).

Nas células vegetais, alguns dos produtos da oxidação destes lípidos funcionam, directamente ou após a alteração enzimática, como mensageiros secundários.

3. METODOLOGIA

Neste capítulo serão descritas as metodologias utilizadas para o desenvolvimento experimental deste estudo, designadamente, a produção das plantas, a simulação de meios de crescimento contaminados com Cd, a avaliação dos níveis de Cd nas diferentes partes da planta, folhas e raízes, bem como a avaliação de algumas alterações fisiológicas resultantes do efeito tóxico deste metal.

3.1. Amostragem

3.1.1 Produção e manutenção da cultura

A produção das plantas de espinafre utilizadas neste trabalho decorreu nas instalações do Horto da Unidade de Investigação de Química Ambiental (UIQA) do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Para a germinação das sementes de espinafre foram utilizadas turfas liofilizadas, previamente hidratadas com água desionizada a cerca de 50 °C. Em cada turfa foram colocadas cerca de 5 a 8 sementes as quais apresentaram uma taxa de germinação de aproximadamente 74 %. Estas foram mantidas numa câmara (figura 5 (c)) com temperaturas diurnas de 20 °C e noturnas de 16 °C, humidade relativa de aproximadamente 65 %, radiação média incidente de 50 % que corresponde a uma intensidade luminosa teórica de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e um fotoperíodo de 12 h, sendo regularmente regadas com água desionizada. A germinação ocorreu entre 3 a 5 dias após sementeira e as plântulas desenvolveram-se neste meio durante cerca de 11 dias.

Com 11 dias de crescimento em turfa, as plântulas foram transferidas para hidroponia em tabuleiros, tendo como suporte esferovite com 50 orifícios e arejamento forçado, e foram mantidas na câmara de crescimento nas condições descritas anteriormente. Nesta fase de transplantação as raízes das plântulas são lavadas, abundantemente, com água desionizada de modo a remover o máximo de resíduos de turfa. Após 13 dias em tabuleiros, as plantas foram transferidas para caixas com capacidade de 2 L nas mesmas condições, mas com 4 plantas por caixa. No geral, para cada ensaio, as plantas estudadas apresentavam, em média, 55 dias de crescimento aquando da aplicação do Cd. Na figura 5, estão representadas imagens das plantas de espinafre nas três fases de produção.

A solução nutritiva utilizada em hidroponia foi a solução de *Hoagland*, cuja composição está descrita no quadro IV. Durante o período de ensaio, devido à evaporação da solução, bem como ao seu consumo por parte das plantas, foi necessário repor a solução de forma a manter o volume constante para que as raízes estivessem sempre imersas.

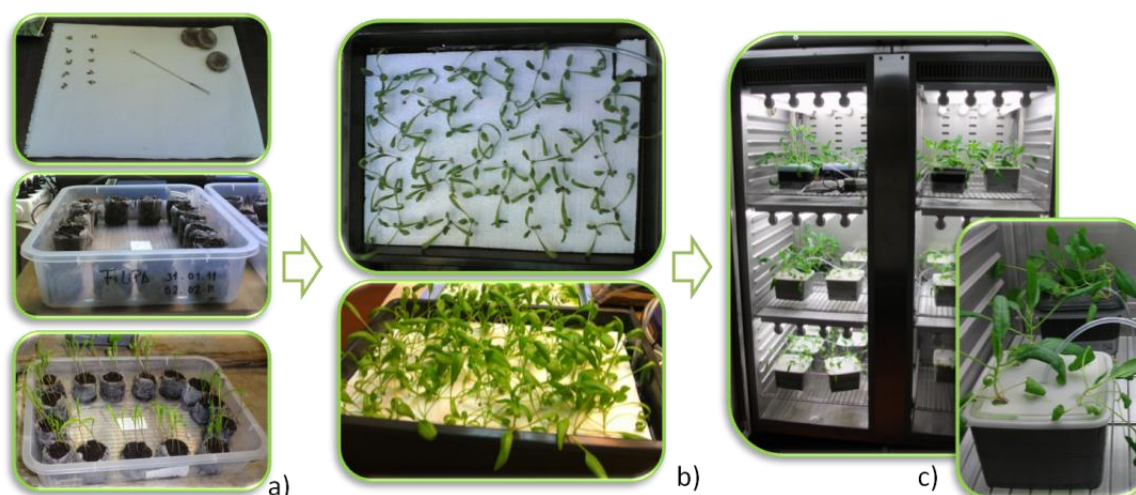


Figura 5 – Ilustração das três etapas de produção:

(a) germinação em turfas; (b) hidroponia em tabuleiro; (c) hidroponia em caixa.

Quadro IV – Concentrações de cada constituinte da solução de Hoagland.

| | Reagente | Concentração total |
|-----------------------------------|--|--------------------|
| Solução de Macronutrientes | $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 6,0 mM |
| | KNO_3 | 6,0 mM |
| | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 2,5 mM |
| | KH_2PO_4 | 1 mM |
| Solução de Micronutrientes | H_3BO_3 | 100 μM |
| | MnSO_4 | 100 μM |
| | ZnSO_4 | 30 μM |
| | Na_2MoO_4 | 1 μM |
| | CoCl_2 | 0,1 μM |
| | CuSO_4 | 0,1 μM |
| | FeNaEDTA | 75 μM |

3.1.2. Aplicação de cádmio

No delineamento do ensaio foram produzidas plantas sem aplicação de Cd (testemunhas - T) e plantas em meios em que foi aplicado Cd em duas concentrações 25 μ M e 50 μ M. Dado que não haveria informação sobre quais as concentrações mais adequadas a aplicar para avaliação de uma resposta ao stresse, foi realizado um ensaio prévio com uma concentração de 10 μ M de Cd. Neste ensaio, verificou-se que a concentração de Cd não foi suficiente para provocar danos visíveis nas plantas, e seria conveniente a utilização de concentrações mais elevadas, pelo que estes resultados não serão apresentados.

Os volumes de solução nutritiva das caixas foram repostos de forma a manter os níveis constantes. Foram adicionados os volumes de solução de cádmio (previamente realizada) correspondentes à modalidade, a cada caixa que não as de controlo, tal como representado no esquema seguinte (figura 6). Cada ensaio teve uma duração de 7 dias, sendo recolhidas amostras ao dia 0, dia 1, dia 2, dia 4 e dia 7 após a aplicação do stresse.



Figura 6 – Esquema de amostras em hidroponia (caixas) com o respectivo código de identificação.

So – *Spinacea oleracea*.

3.1.3. Recolha de amostras

Cada ensaio foi planeado para permitir a recolha diária (nos dias 0, 1, 2, 4 e 7) de quatro amostras de cada modalidade de ensaio (T, 25 μ M e 50 μ M). Estas amostras foram utilizadas para posteriores determinações em fresco ou com material seco, existindo portanto dois tipos diferentes de procedimentos de recolha e de tratamento após recolha.

Para a determinação do conteúdo mineral, as plantas foram recolhidas inteiras sendo apenas feita a separação entre modalidades. No laboratório, para cada planta, foi feito o registo fotográfico, medidos os comprimentos da raiz e parte aérea, contado o número de folhas e determinada a biomassa total. Após estes registos separam-se as folhas e raízes do caule. As raízes foram mergulhadas em solução de cloreto de cálcio a 5 mM durante pelo menos 10 min sendo de seguida passadas repetidamente por água desionizada e cuidadosamente secas em papel (Nocito *et al.*, 2002). Posteriormente, tal como realizado com as folhas, foi determinada a sua massa e colocada em estufa a 60 °C durante cerca sete dias, de modo a remover a água livre (água disponível para reações enzimáticas e crescimento microbiano). A figura seguinte ilustra alguns dos passos referidos neste procedimento.

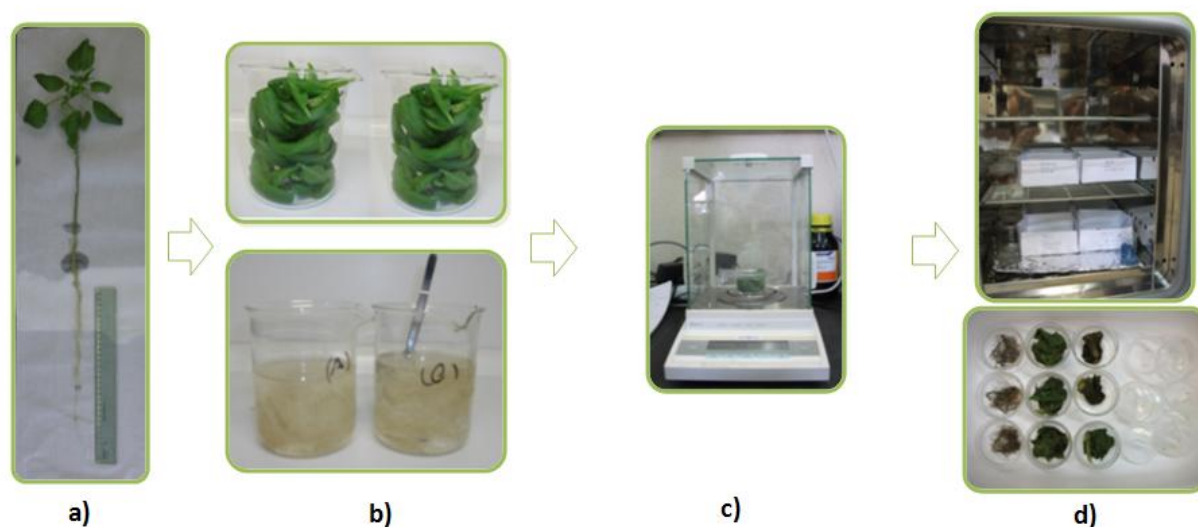


Figura 7 – Ilustração da etapa após recolha para amostras secas:

- (a) Registo de características fisiológicas das plantas;
- (b) Separação de raízes e folhas de plantas contaminadas e testemunhas;
- (c) Determinação de massas de raízes e de folhas;
- (d) Processo de secagem.

Para as determinações que exigiram material fresco, como a determinação do teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), do teor de clorofilas e de MDA, as plantas foram igualmente recolhidas inteiras e posteriormente separadas em amostras de folhas e de raízes. Às folhas foi-lhes retirada a nervura principal, sendo acondicionadas em porções de cerca de 2 g por pacote, devidamente identificados, os quais foram rapidamente congelados em azoto líquido e transferidos para uma câmara de congelação a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. As raízes foram repetidamente passadas por água desionizada, cuidadosamente secas com papel e igualmente acondicionadas em porções de cerca de 2 g por pacote, congelados em azoto líquido e transferidos para a câmara de congelação. A figura 8 ilustra a preparação e armazenamento de amostra descrita.

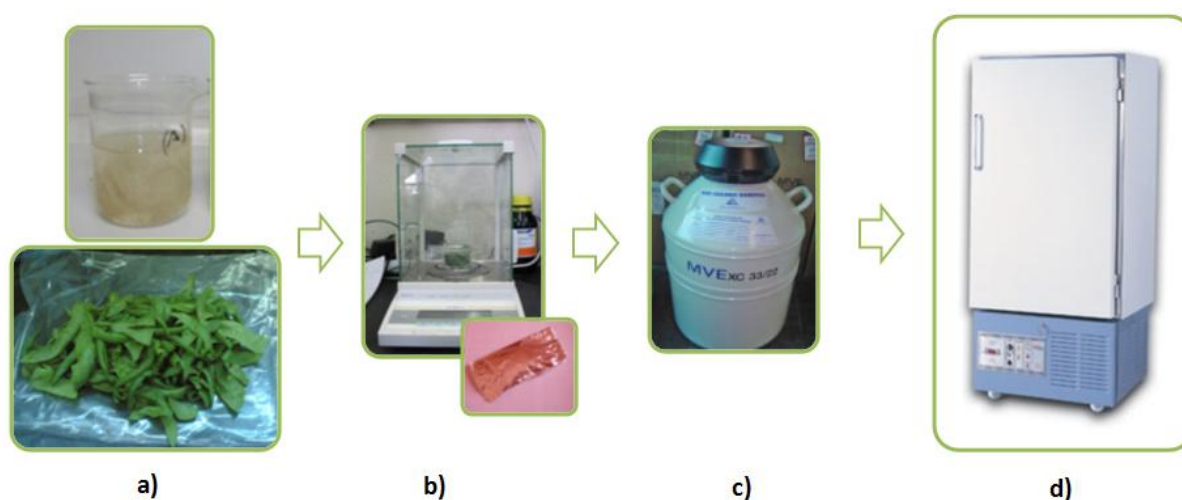


Figura 8 – Ilustração de etapa após recolha para amostras frescas:

- (a) Separação e preparação de raízes e folhas de plantas contaminadas e testemunhas;
- (b) Determinação de massas de cada pacote de raízes e folhas;
- (c) Congelação rápida em azoto;
- (d) Armazenamento a $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

Em todos os ensaios foram realizadas medições não destrutivas de clorofila, com equipamento *Hansatech* (figura 9), sendo medidas duas plantas controlo e duas plantas com stresse induzido, fizeram-se medições em três folhas e tanto do lado direito como esquerdo das folhas, relativamente à nervura principal.



Figura 9 – Ilustração da determinação não destrutiva de clorofila com *Hansatech*.

3.2. Determinações Analíticas

Para avaliar o efeito do cádmio nas plantas de espinafre fizeram-se diversas determinações analíticas tais como: teor de matéria seca; teores de clorofila; composição mineral; determinação da peroxidação dos lípidos e quantificação de peróxido de hidrogénio intracelular. Posteriormente surgiu ainda a necessidade de quantificar o azoto nítrico, na esperança de auferir respostas a dúvidas que emergiram dos resultados obtidos.

3.2.1. Teor de matéria seca

Para a determinação do teor de massa seca utilizaram-se as amostras que foram a secar à estufa a 60 °C. O seu peso já teria sido determinado em fresco e foi determinado novamente ao fim de sete dias referidos. Com as massas determinadas é possível obter o teor de massa seca, em percentagem (%), pela seguinte expressão:

$$\%MS = \frac{(Massa_{seca} \times 100)}{Massa_{fresca}}$$

As amostras secas foram moídas num almofariz com pilão previamente à determinação do conteúdo mineral.

3.2.2. Determinação do conteúdo mineral

Os minerais estudados foram o cádmio, o zinco, o cobre, o ferro, o manganês, o cálcio e o magnésio utilizando o método descrito por Rao & Sresty (2000) e mais recentemente por Singh *et al.* (2006). Para determinar o teor destes minerais foram transferidos para tubos *teflon* 0,5 g de amostra, já desidratada e macerada e 5 mL de ácido nítrico (HNO₃). Após terem sido devidamente fechados, estes tubos, com amostra e outro com ácido nítrico (HNO₃), foram ligados a um equipamento que os submeteu a microondas. Este processo, por submeter a amostra a elevadas temperaturas e pressões, permite digerir rapidamente toda a matéria orgânica libertando dióxido de carbono e vapor de água. Após terminar o processo de digestão ácida (30 min) e de arrefecidos os tubos à temperatura ambiente, transferiu-se na *hotte* (devido à libertação de gases contendo ácido nítrico), o conteúdo para um balão volumétrico de 25 mL, sendo então o volume acertado com água desionizada.

Os extractos obtidos foram posteriormente utilizados para a determinação destes minerais num espectrofotómetro de absorção atómica (EAA) em câmara de grafite.

3.2.3. Determinação analítica do teor de clorofilas

A determinação do teor de clorofila baseou-se no método descrito por Singh *et al.* (2006). O extracto foi obtido a partir de 0,06 g de folha fresca em 10 mL de solução acetona/Tris (80:20), sendo acetona e o tampão Tris a 100 mM a pH 7,8, armazenados no frio. O extracto foi centrifugado a 10 000 x *g* durante 15 min e a 6 °C, sendo lida a absorvância do sobrenadante no espectrofotómetro (*Hitachi 2000*) a 470, 537, 647, 663 nm. Para conversão de absorvância em teor de clorofilas a, b e totais utilizaram-se as equações de Sims & Gamon (2002):

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{mol.mL}^{-1}): 0,01373.A_{663} - 0,000897.A_{537} - 0,003046.A_{647}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{mol.mL}^{-1}): 0,02405.A_{647} - 0,004305.A_{537} - 0,005507.A_{663}$$

$$\text{Clorofila total } (\mu\text{mol.mL}^{-1}): \text{Clorofila}_a + \text{Clorofila}_b$$

3.2.4. Determinação da peroxidação de lípidos

A peroxidação dos lípidos foi determinada pela medição de malondialdeído (MDA) produzido, usando o método com ácido tiobarbiturico (TBA) descrito por Rao & Sresty (2000) e mais recentemente por Demiral e Turkan (2005).

Para a extracção de MDA, foram maceradas 0,5 g de amostra fresca, tanto de raiz como de folha, com 2,5 mL de ácido ticloroacético (TCA) a 0,1 % (p/v); o procedimento de preparação de amostras foi realizado em triplicado. Os extractos obtidos foram centrifugados a 10 000 x *g* durante 15 min. A todas as amostras foi extraído 1 mL de sobrenadante e adicionado a 4 mL de solução de TCA a 20 % (p/v) e TBA a 0,5 % (p/v). Esta mistura foi submetida a um banho de 30 min a aproximadamente 95 °C, seguido de um arrefecimento rápido num banho de gelo. Após o arrefecimento a mistura foi submetida a um processo de centrifugação a 10 000 x *g* durante 15 min e foi lida a absorvância do sobrenadante (em duplicado) a um comprimento de onda de 532 nm. As medições foram corrigidas para a turbidez não específica por subtracção dos valores de absorvância a um comprimento de onda de 600 nm.

A concentração de MDA (expressa em $\mu\text{M g}^{-1}$ PF) foi calculada usando o coeficiente de absortividade molar deste composto, 155,10 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$, segundo a função:

$$MDA = \frac{(Abs_{532}) - (Abs_{600})}{155,10}$$

3.2.5. Determinação do teor de peróxido de hidrogénio

O extracto para a determinação da concentração de H_2O_2 foi obtido do mesmo modo que para determinar a peroxidação dos lípidos. O restante procedimento baseou-se no método descrito por Singh *et al.* (2006).

Ao extracto centrifugado foram retirados 500 μL de sobrenadante, aos quais foram adicionados 500 μL de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,6) e 1 mL de solução de iodeto de potássio (KI) a 1 M. A absorvância da mistura foi lida a um comprimento de onda de 390 nm.

Neste procedimento a quantificação do H_2O_2 foi obtida a partir da elaboração de uma curva padrão; realizada a partir de uma solução inicial com a concentração de 0,15 mM, tendo sido utilizados seis padrões com as concentrações 0, 1, 2, 3, 4 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Singh *et al.*, 2006).

3.2.6. Determinação do teor de azoto nítrico total (*SKALAR Methods*)

O procedimento automatizado para a determinação de nitratos e nitritos baseia-se no método de redução de cádmio; a amostra passa por uma coluna constituída por cobre e cádmio granulado para reduzir o ião nitrato a ião nitrito. Por sua vez, o nitrito é determinado pela diazotação com sulfanilamida e acoplamento com dicloridrato de α -naftiletilenodiamina para formar um composto corado.

Para determinar o azoto nítrico presente em cada amostra foi necessário preparar soluções com concentrações de 1:10 (amostra:água). O extracto de cada amostra, foi obtido por maceração de 1 g de amostra em 2 mL de água desionizada. Ao extracto foram adicionados mais 8 mL de água desionizada e centrifugado a 10 000 x g durante 15 min. As soluções foram armazenadas a -20 °C até efectuar a determinação analítica. Antes de cada leitura as amostras foram centrifugadas novamente a 10 000 x g durante 10 min.

As leituras foram efectuadas por espectrofotometria num equipamento SKALAR que acopla vários processos, entre os quais os que originam as reacções descritas e que está ilustrado na figura 10. A absorvância do composto em estudo (o nitrito) foi lida a um comprimento de onda definido a 540 nm.



Figura 10 – Equipamento SKALAR utilizado para determinar o azoto nítrico nas amostras de espinafre.

3.3. Tratamento estatístico

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente, por recurso ao programa estatístico “SPSS Statistics 17.0” (SPSS Inc.).

Aos resultados foi aplicada a análise de variância a um factor (ANOVA), para avaliar o efeito dos diferentes tratamentos com cádmio durante os 7 dias. Para comparação das médias utilizou-se o teste Tukey, para um nível de confiança de 95 %.

As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias de cada dia para cada modalidade de ensaio (T, 25 ou 50) e as maiúsculas indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos ensaios. Estas letras apenas estão presentes quando existem diferenças significativas.

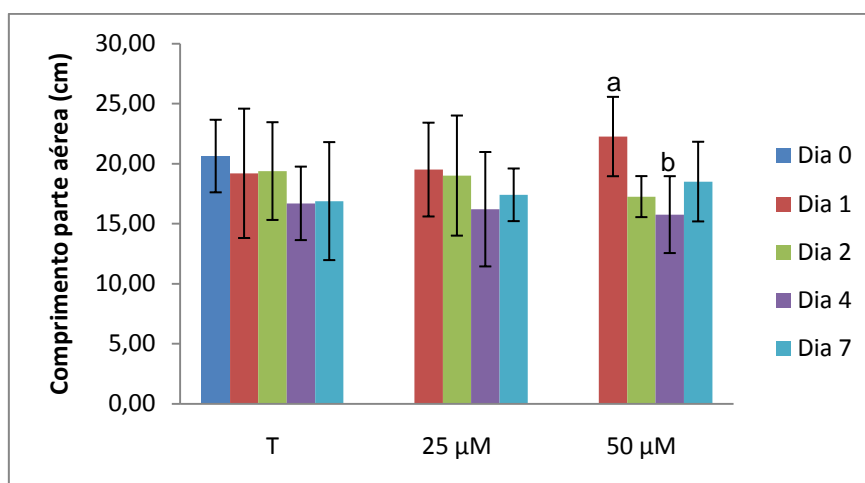
As barras de erro das colunas nos gráficos apresentados, representam o desvio padrão (DP) da média das amostras.

Foram ainda estabelecidas correlações para cada uma das modalidades de ensaio (T, 25 μM , 50 μM) relativamente à variação do tempo de exposição ao Cd (0, 1, 2, 4, 7 dias), utilizando o coeficiente de correlação de *Pearson*, obtido pelo programa Excel.

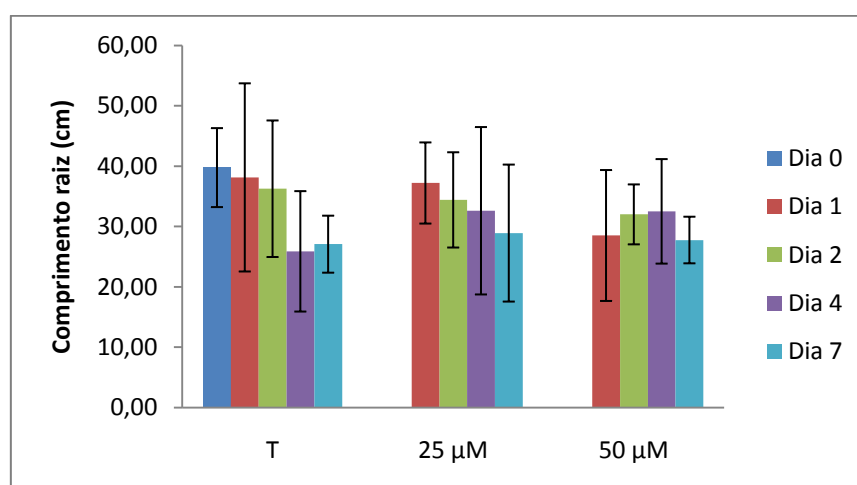
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito do cádmio nos parâmetros fisiológicos

Os parâmetros fisiológicos avaliados foram os comprimentos de raiz e parte aérea, número de folhas, biomassa total e biomassa seca de raízes e das folhas. Na figura 11 estão representados os gráficos de variação do comprimento da parte aérea e de raízes de plantas em estudo (testemunha e plantas contaminadas com 25 μ M e 50 μ M de cádmio).



(A)



(B)

Figura 11 - Comprimentos médios da parte aérea (A) e raiz (B) de plantas em estudo, ao longo de 7 dias de ensaio e expostas a diferentes concentrações de cádmio. As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias de cada dia para cada modalidade de ensaio (T, 25 ou 50); $n=4$.

As plantas estudadas apresentaram comprimentos médios da parte aérea de aproximadamente 32 cm e de raiz, aproximadamente 18 cm.

Os comprimentos da parte aérea das plantas e da raiz foram muito variáveis (DP face à média igual ou superior a 15 %), verificando-se pelas indicações dos gráficos a inexistência de diferenças significativas entre as diferentes condições dos ensaios. Nos resultados obtidos apenas existe um declínio significativo do comprimento da parte aérea do dia 1 para o dia 4 quando exposto a 50 μM de cádmio.

Apesar da maioria destas variações não serem significativas, é possível verificar que, para ambas as partes da planta, folhas e raiz, existe uma tendência para a diminuição do comprimento ao longo do tempo de crescimento, o que no caso dos meios contaminados se pode dever à exposição ao metal. Estes resultados parecem indicar que estas concentrações de cádmio não afectaram visivelmente o crescimento da parte aérea e da raiz das plantas. No entanto, estes resultados são influenciados pela variabilidade significativa constactada nas amostras obtidas, o que pode ser verificado pelo valor do desvio padrão obtido. Esta variabilidade das plantas torna necessária a realização de ensaios com um número muito mais elevado de plantas (>> 4 plantas).

Na figura 12 está representado o número médio de folhas das plantas sujeitas aos ensaios de indução de stresse com cádmio.

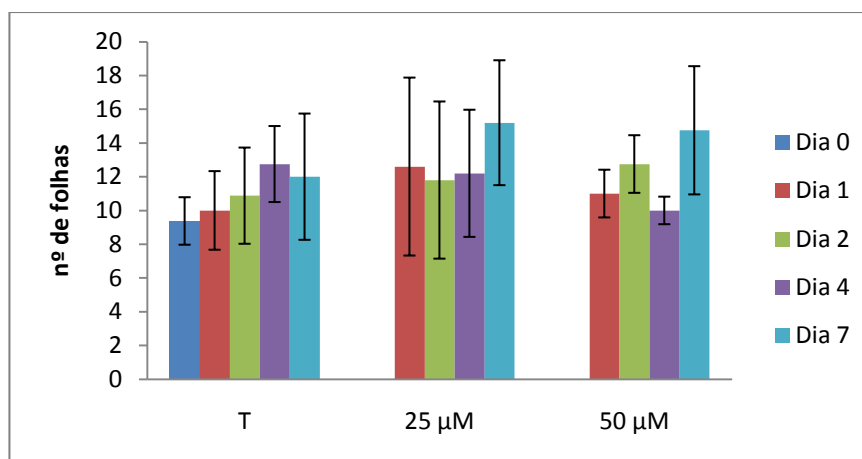


Figura 12 - Número médio de folhas e respectivo desvio padrão, de plantas de espinafre exposta a concentrações de 0, 25 e 50 μM de cádmio durante 7 dias; n=4.

Pelo gráfico da figura 12, verifica-se uma tendência para aumento do número médio de folhas por planta ao longo dos dias, tal como é de esperar visto que a planta se está a desenvolver. Além disso, verifica-se que o número de folhas por planta é superior nos ensaios contaminados com cádmio. Tanto para o ensaio de 25 μM como de 50 μM de cádmio, destaca-se o aumento de folhas no último dia de ensaio. Contudo as variações descritas não são estatisticamente significativas ao nível significância de 95 %, não podendo afirmar a existência de indução do crescimento de folhas pela

exposição ao Cd. Também aqui se reflecte o problema anteriormente referido, isto é, verificou-se uma enorme variabilidade deste parâmetro nas plantas obtidas.

Na figura 13 estão apresentadas as variações temporais, do teor de matéria seca de folhas e raízes nas amostras em estudo.

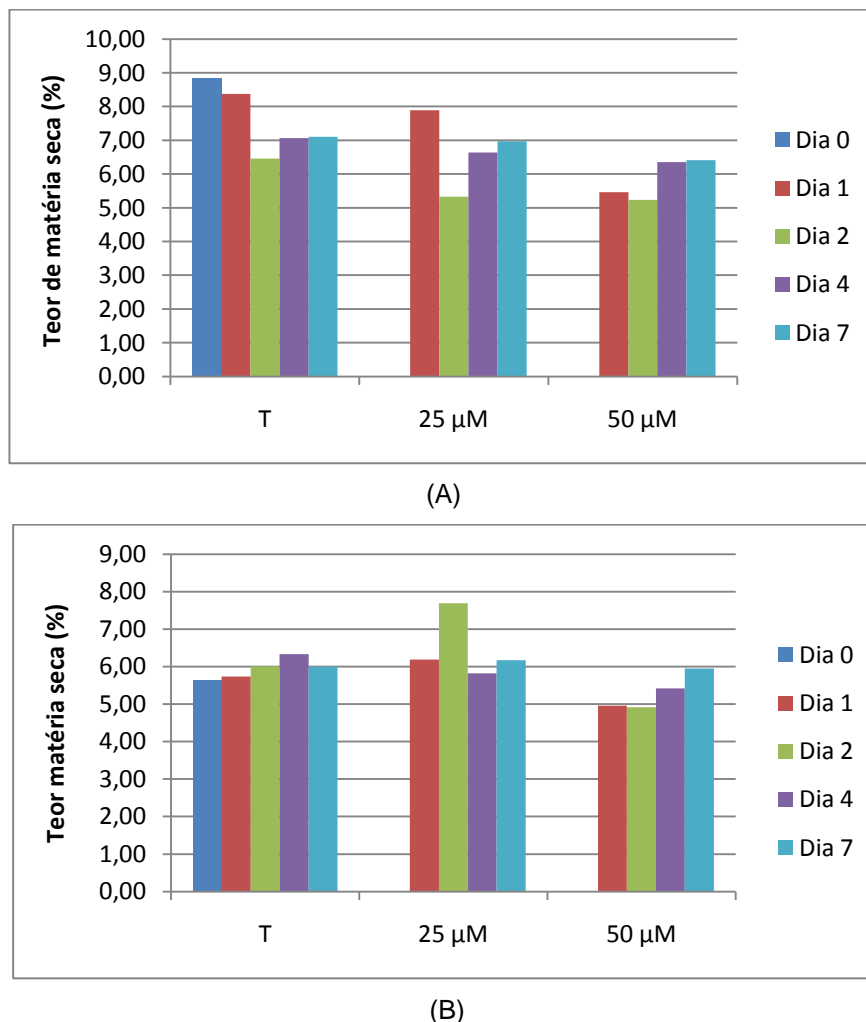


Figura 13 - Teor de matéria seca de folhas (A) e raiz (B), em percentagem, ao longo de 7 dias e em plantas sujeitas às diferentes concentrações de cádmio (T, 25 µM, 50 µM).

Pela análise da figura 13 (A) verifica-se uma tendência para a diminuição do teor de matéria seca (MS) das folhas, de amostras contaminadas em relação à testemunha (T) para todos os tempos do ensaio. Embora as folhas das plantas expostas ao Cd tenham apresentado valores de matéria seca mais baixos em relação à T, verifica-se uma tendência para um aumento da MS para tempos de crescimento mais longos, especialmente no caso do ensaio com 50 µM. Este resultado pode estar relacionado com o facto de o cádmio diminuir a absorção não só de alguns elementos minerais como também de água, podendo indicar algum efeito tóxico na planta (di Toppi & Gabbrielli, 1999).

No caso das raízes (figura 13 (B)), apenas se verifica uma tendência para o aumento do teor de matéria seca de raiz para o ensaio que decorreu com contaminação de cádmio a 50 µM.

Aparentemente os valores de MS da raiz destas plantas são inferiores às restantes, designadamente em relação à T e às amostras de 25 μM . A amostra utilizada para a determinação da MS foi obtida a partir de 4 plantas. Dado que não foi possível produzir mais plantas, não foram realizadas repetições, pelo que para este parâmetro não foi efectuada uma análise de variância e comparação de médias.

A figura 14 representa a variação da biomassa total de plantas contaminadas e não contaminadas durante sete dias de exposição.

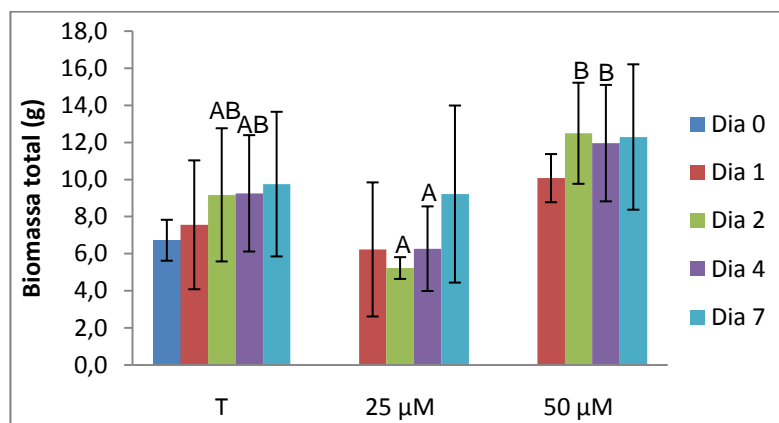


Figura 14 – Variação média da biomassa total (g) de plantas de espinafre sem contaminação (T) e expostas a stresse com 25 e 50 μM de cádmio, durante 7 dias. As letras maiúsculas indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos ensaios, para cada dia; $n=4$.

Para as 3 modalidades consideradas verificou-se uma tendência para o aumento gradual da biomassa total, ao longo do tempo. Verifica-se, para a média de amostras contaminadas com 25 μM de Cd, um menor teor de biomassa total e um maior para as contaminadas com 50 μM de Cd. Contudo as diferenças significativas apenas são evidentes no dia 2 e dia 4, entre as amostras referidas (25 e 50 μM de Cd). Em relação à testemunha não existem variações significativas quando consideramos o efeito do tempo de crescimento, significando que em sete dias a média de biomassa de plantas não aumentou significativamente.

Face à biomassa total só se verifica um efeito negativo evidente para as plantas contaminadas com 25 μM de cádmio. No ensaio com contaminação de 25 μM de cádmio verifica-se um decréscimo neste parâmetro face à testemunha. Pelo contrário no ensaio com 50 μM existe um aumento da biomassa face à testemunha. Este facto poderá estar relacionado com o desencadear de algum mecanismo de defesa da planta em resposta à presença de cádmio, que apenas se tornaria activo para concentrações superiores deste contaminante. Outras possibilidades seriam a existência de um mecanismo de crescimento induzido pelo cádmio para concentrações na ordem dos 50 μM ou ainda motivos relacionados com a variabilidade de crescimento das plantas.

Este tipo de resultados raramente são referidos em publicações, provavelmente devido à sua enorme variabilidade, que não depende apenas das condições do ensaio mas essencialmente da genética

das plantas. A variabilidade do material vegetal em estudo não permitiu obter resultados com conclusões significativas; para atenuar esta limitação seriam necessárias mais repetições de cada parâmetro. Contudo isso implicaria fazer cada ensaio três vezes, o que não foi possível nem física nem temporalmente, sendo dada preferência a repetições de outras determinações.

Os resultados de parâmetros fisiológicos obtidos indicam que, nas concentrações utilizadas, o cádmio não afecta visivelmente o comprimento da parte aérea e da raiz nem o número médio de folhas. Assim, aparentemente, não afecta negativamente o crescimento da planta, e até parece indicar algum efeito promotor do crescimento, tal como descrito por outros autores como Pinto *et al* (2009).

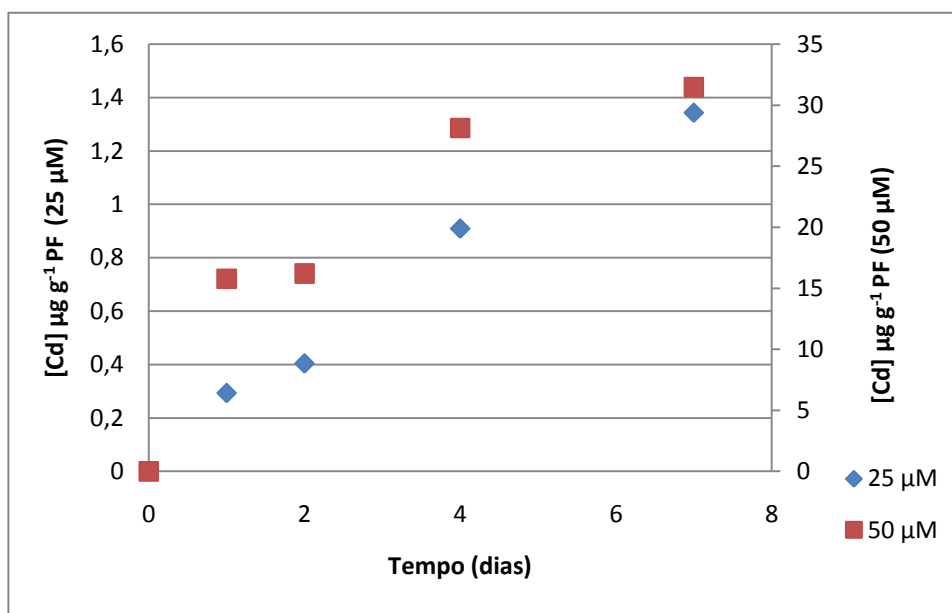
Nas folhas das plantas expostas ao Cd verifica-se uma tendência para um aumento da MS para tempos de crescimento mais longos, especialmente no caso do ensaio com 50 μM . Contudo a MS das folhas contaminadas com 50 μM é inferior às da T, podendo ser explicado pela diminuição da absorção de água pelas plantas como resultado do efeito tóxico. No caso das raízes, apenas se verificou um aumento do teor de MS para o ensaio que decorreu a 50 μM de Cd.

Contudo, contrariamente ao que seria esperado, a biomassa total aumentou no ensaio com 50 μM verificando-se um efeito favorável ao crescimento da planta na presença de Cd.

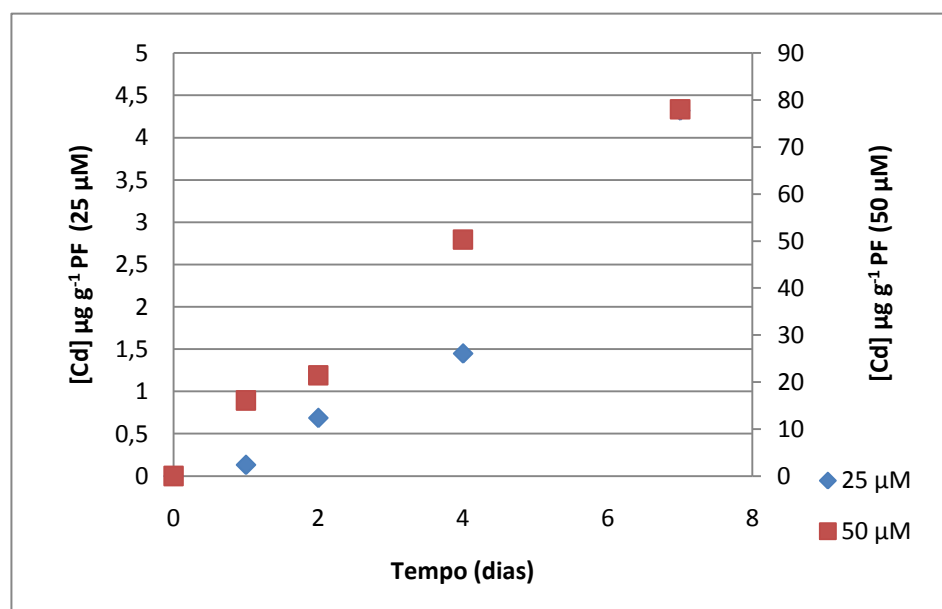
Face a estas possibilidades foram posteriormente efectuadas determinações analíticas de outros parâmetros no sentido de avaliar possíveis explicações para estes resultados, e que serão apresentados nos capítulos seguintes.

4.2. Avaliação do conteúdo mineral

A avaliação do teor mineral permitiu verificar a quantidade de cádmio presente nos tecidos das plantas em estudo (figura 15), bem como de outros elementos naturalmente presentes nesses tecidos vegetais.



(A)



(B)

Figura 15 – Teor de cádmio ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF) em folhas (A) e raiz (B) de plantas de espinafre expostas a stresse com 25 e 50 μM de cádmio, durante 7 dias de ensaio.

O teor de cádmio nas testemunhas não foi detectado, o que significa que se encontra em concentrações abaixo do limite de detecção tal como se esperava, visto não ter sido adicionado à solução nutritiva utilizada no estudo.

Os níveis de cádmio detectados nas amostras contaminadas, demonstram que quanto maior a concentração e o tempo de exposição, maior o teor de cádmio presente nos tecidos. No entanto, não existe uma proporcionalidade directa entre concentração aplicada e concentração absorvida. Além disso, verifica-se pelos gráficos da figura 15 que o cádmio presente na raiz é superior (3 a 4 vezes) ao das folhas, demonstrando uma maior acumulação deste metal nas raízes.

De seguida são apresentados os quadros do teor mineral de Zn, Cu, Fe, Mn, Ca e Mg (Quadro V, Quadro VI, Quadro VII, Quadro VIII, Quadro IX, Quadro X, respectivamente) em folhas e raiz de plantas de espinafre em estudo, determinados por espectrofotometria de absorção atómica e expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco.

Quadro V – Teor mineral de zinco, em $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco, determinado em folhas e raiz de plantas de *S. oleracea* sem contaminação (T) e exposta a concentrações de 25 e 50 μM de cádmio, durante 7 dias.

| Teor de Zinco (Zn) em Folhas ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) | | | | | |
|---|--------|---------|--------|---------|---------|
| [Cd] | Dia 0 | Dia 1 | Dia 2 | Dia 4 | Dia 7 |
| T | 400,90 | 375,89 | 436,08 | 378,31 | 598,96 |
| 25 μM | 400,90 | 384,07 | 390,94 | 405,96 | 368,04 |
| 50 μM | 400,90 | 1157,77 | 930,32 | 1101,01 | 1240,61 |
| Teor de Zinco (Zn) em Raiz ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) | | | | | |
| [Cd] | Dia 0 | Dia 1 | Dia 2 | Dia 4 | Dia 7 |
| T | 398,80 | 384,95 | 462,82 | 421,12 | 423,07 |
| 25 μM | 398,80 | 453,70 | 381,40 | 351,56 | 404,47 |
| 50 μM | 398,80 | 784,20 | 648,32 | 1049,48 | 1500,37 |

Pelo quadro V, verifica-se tanto em folhas como em raiz, um teor mais elevado de Zn em amostras contaminadas com 50 μM de Cd; e as amostras contaminadas com 25 μM , não diferem face às não contaminadas. A concentração de 25 μM de Cd parece não ter influência na absorção de Zn. Para a concentração de 50 μM de Cd verifica-se uma tendência para um aumento do Zn ao longo do tempo de exposição. Ao fim de sete dias de exposição, tanto as folhas como as raízes, apresentaram um teor de Zn cerca de duas a três vezes superior ao da testemunha e das amostras expostas a 25 μM de Cd.

O teor médio de Zn em folhas, ao longo dos sete dias para plantas não contaminadas foi de 438,03 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS, enquanto que outros autores determinaram valores máximos de 90 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS (INSA) e 195,99 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS, igualmente em folhas de espinafre não contaminadas (Sinha *et al.*, 2006).

Quadro VI – Teor mineral de cobre, em $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco, determinado em folhas e raiz de plantas de *S. oleracea* sem contaminação (T) e exposta a concentrações de 25 e 50 μM de cádmio, durante 7 dias.

| Teor de Cobre (Cu) em Folhas ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| [Cd] | Dia 0 | Dia 1 | Dia 2 | Dia 4 | Dia 7 |
| T | 7,90 | 8,03 | 7,96 | 8,07 | 11,00 |
| 25 μM | 7,90 | 7,57 | 7,17 | 6,86 | 6,89 |
| 50 μM | 7,90 | 20,49 | 20,93 | 16,35 | 16,52 |
| Teor de Cobre (Cu) em Raiz ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) | | | | | |
| [Cd] | Dia 0 | Dia 1 | Dia 2 | Dia 4 | Dia 7 |
| T | 9,98 | 7,84 | 9,17 | 8,69 | 9,97 |
| 25 μM | 9,98 | 8,38 | 7,21 | 8,94 | 5,51 |
| 50 μM | 9,98 | 18,94 | 17,50 | 22,44 | 15,07 |

No quadro VI, tanto em folhas como raiz, verifica-se que o Cu apresenta um comportamento semelhante ao Zn, onde se destacam as amostras contaminadas com 50 μM de Cd com uma concentração maior de Cu. As diferenças entre as amostras do ensaio T e 25 μM são apenas visíveis ao sétimo dia, onde existe uma maior concentração de Cu nas amostras testemunha. Tal como se verificou para o Zn, também existe uma influência do Cd, apenas, nos teores de Cu em folhas e raízes expostas a 50 μM de Cd, sendo que ao sétimo dia estas plantas apresentavam duas a três vezes mais Cu que as outras modalidades.

O teor médio de Cu nas folhas, ao longo de 7 dias, nas amostras testemunha foi de 8,59 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS, enquanto Sinha *et al.* (2006), determinou valores de 15,40 a 32,88 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS, também em espinafre.

Quadro VII - Teor mineral de ferro, em $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco, determinado em folhas e raiz de plantas de *S. oleracea* sem contaminação (T) e exposta a concentrações de 25 e 50 μM de cádmio, durante 7 dias.

| Teor de Ferro (Fe) em Folhas ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) | | | | | |
|---|--------|--------|-------|--------|--------|
| [Cd] | Dia 0 | Dia 1 | Dia 2 | Dia 4 | Dia 7 |
| T | 80,72 | 85,50 | 92,34 | 81,92 | 120,38 |
| 25 μM | 80,72 | 89,13 | 86,14 | 77,09 | 83,14 |
| 50 μM | 80,72 | 59,77 | 59,69 | 56,68 | 150,56 |
| Teor de Ferro (Fe) em Raiz ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) | | | | | |
| [Cd] | Dia 0 | Dia 1 | Dia 2 | Dia 4 | Dia 7 |
| T | 123,34 | 97,28 | 99,31 | 95,73 | 100,51 |
| 25 μM | 123,34 | 102,36 | 95,72 | 95,95 | 87,25 |
| 50 μM | 123,34 | 111,35 | 91,64 | 111,46 | 88,79 |

Os teores de Fe determinados apresentam a mesma gama de valores para todos os ensaios (T, 25 μM , 50 μM), ao longo dos sete dias, especialmente na raiz, o que significa que a concentração de Fe não foi alterada pela absorção de Cd. De facto, os valores obtidos em todas as modalidades testadas são semelhantes, bem como a sua variação ao longo do tempo de ensaio. Este resultado pode explicar o facto de não se ter verificado uma clorose, que resulta normalmente de uma consequência de carência em Fe. No ponto 4.3. serão apresentados os resultados da avaliação do teor de clorofila.

Os valores de Fe em folhas de espinafre não contaminadas descritos por outros autores são muito variáveis, tendo sido determinados valores de 24 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS (INSA) e valores entre 393 e 1411 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS (Sinha *et al.*, 2006). No presente estudo estes valores correspondem a uma média de Fe nas amostras testemunha de 92,17 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS.

Quadro VIII – Teor mineral de manganês, em $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco, determinado em folhas e raiz de plantas de *S. oleracea* sem contaminação (T) e exposta a concentrações de 25 e 50 μM de cádmio, durante 7 dias.

| Teor de Manganês (Mn) em Folhas ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) | | | | | |
|--|--------|--------|--------|--------|---------|
| [Cd] | Dia 0 | Dia 1 | Dia 2 | Dia 4 | Dia 7 |
| T | 656,12 | 705,25 | 869,52 | 679,95 | 1361,08 |
| 25 μM | 656,12 | 758,11 | 820,80 | 892,36 | 904,19 |
| 50 μM | 656,12 | 507,97 | 488,38 | 862,06 | 918,35 |
| Teor de Manganês (Mn) em Raiz ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) | | | | | |
| [Cd] | Dia 0 | Dia 1 | Dia 2 | Dia 4 | Dia 7 |
| T | 771,43 | 690,96 | 798,23 | 643,74 | 803,10 |
| 25 μM | 771,43 | 968,69 | 734,10 | 611,14 | 876,53 |
| 50 μM | 771,43 | 273,54 | 257,30 | 411,54 | 1167,81 |

Analisando os valores representados no quadro VIII, verifica-se uma influência negativa do Cd na concentração de Mn na planta de espinafre. Observa-se um decréscimo mais acentuado em folhas e notoriamente, na raiz, para os dias 1 e 2 de exposição em plantas contaminadas com 50 μM , podendo sugerir uma perturbação na absorção de Mn, por exemplo por competição de metais, que é ultrapassada ao quarto dia. No entanto, se considerarmos a variação ao longo do tempo, para cada modalidade, verifica-se uma tendência para um aumento pouco acentuado dos teores de Mn, tanto em folhas como em raízes, apresentando valores mais elevados ao sétimo dia.

O teor médio deste metal em folhas de amostras T é de 854,38 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS, enquanto que Sinha *et al.* (2006), determinou valores máximos de 138,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS de folhas de espinafre.

Quadro IX - Teor mineral de cálcio, em $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco, determinado em folhas e raiz de plantas de *S. oleracea* sem contaminação (T) e exposta a concentrações de 25 e 50 μM de cádmio, durante 7 dias.

| Teor de Cálcio (Ca) em Folhas ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) | | | | | |
|--|----------|----------|----------|----------|----------|
| [Cd] | Dia 0 | Dia 1 | Dia 2 | Dia 4 | Dia 7 |
| T | 12316,05 | 11516,12 | 12893,17 | 14634,39 | 24180,04 |
| 25 μM | 12316,05 | 11184,90 | 12787,74 | 13964,86 | 14851,37 |
| 50 μM | 12316,05 | 10812,72 | 6741,86 | 6732,04 | 7432,76 |
| Teor de Cálcio (Ca) em Raiz ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) | | | | | |
| [Cd] | Dia 0 | Dia 1 | Dia 2 | Dia 4 | Dia 7 |
| T | 11208,07 | 12274,45 | 12505,80 | 11097,58 | 13145,94 |
| 25 μM | 11208,07 | 12797,91 | 12700,00 | 11915,87 | 15243,57 |
| 50 μM | 11208,07 | 6918,78 | 7065,31 | 11544,32 | 14638,48 |

O teor de Ca em folhas (quadro IX) de plantas contaminadas com 50 μM decresce face aos ensaios T e 25 μM , sugerindo uma interferência do cádmio no transporte deste metal para a parte aérea. Ao sétimo dia de ensaio verifica-se que a concentração de Ca é afetada pela exposição ao Cd, podendo sugerir um efeito competitivo a longo prazo ou por acumulação. Este aspecto é particularmente importante para a alimentação pois o espinafre é considerado um vegetal rico em Ca.

O teor médio de Ca obtido em folhas de plantas T é de 15107,9 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS. Outros autores referem teores de 1040 a 2160 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS, em folhas de *Spinacea Oleracea* (INSA; Nishihara *et al.*, 2001).

Quadro X – Teor de mineral de magnésio, em $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco, determinado em folhas e raiz de plantas de *S. oleracea* sem contaminação (T) e exposta a concentrações de 25 e 50 μM de cádmio, durante 7 dias.

| Teor de Magnésio (Mg) em Folhas ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) | | | | | |
|--|----------|----------|----------|----------|----------|
| [Cd] | Dia 0 | Dia 1 | Dia 2 | Dia 4 | Dia 7 |
| T | 10134,98 | 8875,57 | 10659,97 | 10256,70 | 16236,07 |
| 25 μM | 10134,98 | 9544,93 | 9534,18 | 9890,46 | 10266,01 |
| 50 μM | 10134,98 | 5427,08 | 5603,69 | 5813,91 | 6405,53 |
| Teor de Magnésio (Mg) em Raiz ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) | | | | | |
| [Cd] | Dia 0 | Dia 1 | Dia 2 | Dia 4 | Dia 7 |
| T | 11526,96 | 10193,87 | 11041,45 | 12434,19 | 12045,53 |
| 25 μM | 11526,96 | 12695,46 | 10750,00 | 10144,56 | 12061,80 |
| 50 μM | 11526,96 | 7440,57 | 6997,84 | 6154,25 | 7532,62 |

Por análise do quadro X, é possível afirmar que a contaminação de plantas de espinafre com concentrações de 50 μM afectou negativamente a concentração de Mg tanto em folhas como na raiz.

O teor médio de Mg em folhas de plantas não contaminadas determinado neste trabalho foi 11232,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS, enquanto outros autores referem valores de 540 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS (INSA) e 4000, 6500 e 7630 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS (Nishihara *et al.*, 2001)

A comparação do teor mineral de folhas de *S. oleracea* não contaminadas, determinados durante este trabalho e os referidos por outros autores, torna possível afirmar que estes variam em função do tipo de meio de crescimento da cultura. Pela inexistência de estudos semelhantes (efectuados em hidroponia) torna-se mais relevante comparar a tendência destes teores ao longo do tempo e de compará-los com os teores de plantas contaminadas.

O teor de Cd não é absorvido de forma proporcionalmente directa face à contaminação; no entanto verifica-se que para o ensaio de 50 μM em folhas e raiz, a concentração de Cd é largamente superior à do ensaio com 25 μM (cerca de 24 vezes superior em folhas e 17 na raiz). As plantas expostas a maiores concentrações de cádmio (50 μM), apresentam maiores concentrações dos elementos Zn e Cu, pressupondo a estimulação da entrada e mobilização destes elementos na planta. Os elementos Fe e Mn não apresentam grandes variações entre ensaios sem exposição e com exposição ao Cd, não sendo afectado pelo Cd, o transporte destes elementos para as plantas. Os elementos Ca e Mg encontraram-se presentes em valores mais baixos quando a planta foi exposta a concentrações superiores de cádmio aparentando existir competição pelo transporte destes elementos e do Cd para a planta.

Segundo os estudos de Clemens (2002 e 2006), e perante estes resultados pressupõe-se a entrada de cádmio na planta pela via de transporte de Ca (LCT1) e Mg; e pelas proteínas transportadoras da família ZIP e Nramp, responsáveis pelo transporte de Zn e Cu (respectivamente). A possibilidade de o Zn e o Cu estarem associados ao mesmo transportador poderia explicar o aumento dos dois na mesma proporção, tal como foi verificado. Relativamente ao Ca e ao Mg, o facto do transportador poder ser também o mesmo que para o Cd, poderá significar que existe uma competição entre estes iões na sua absorção pela planta, justificando assim o aumento da concentração de Cd e a diminuição do Ca e Mg. Embora estas suposições sejam um pouco ambiciosas e não sejam totalmente suportadas por este trabalho, este aspecto poderá ser um ponto importante a explorar em estudos futuros.

4.3. Efeito do cádmio no teor de clorofila

O estudo do efeito do cádmio no teor de clorofila nas folhas de espinafre foi efectuado através da determinação quantitativa da clorofila e pela avaliação por métodos não destrutivos com recurso ao equipamento *Hansatech*.

4.3.1. Determinação do teor de clorofila por espectrofotometria

Na figura 16 é possível observar a variação do teor de clorofila determinado por espectrofotometria, em plantas sujeitas aos três ensaios efectuados.

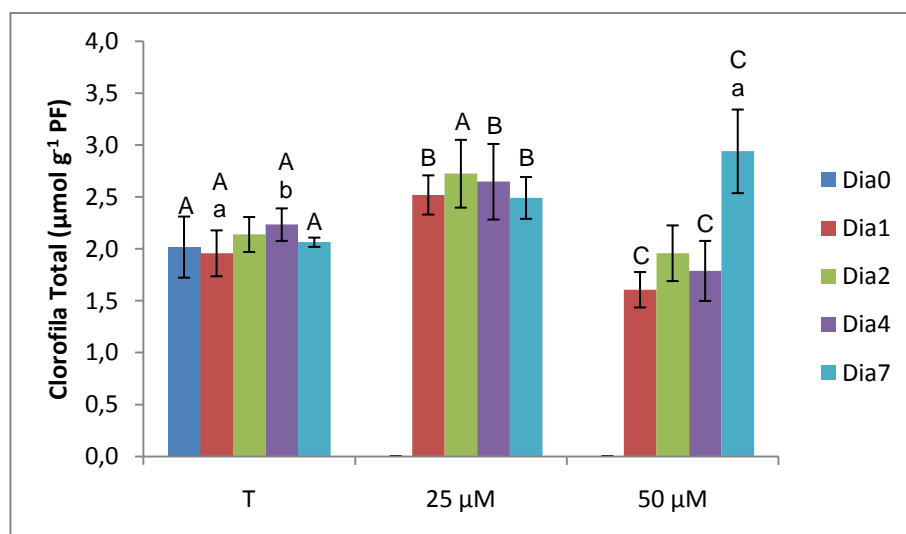


Figura 16 - Teor médio de clorofila expresso em $\mu\text{mol g}^{-1}$ de peso fresco (PF) de folha, para as amostras T e com contaminação de 25 e 50 μM de cádmio, durante 7 dias de exposição. As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias de cada dia para cada modalidade de ensaio (T, 25 ou 50), e as maiúsculas indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos ensaios, para cada dia.

A partir dos dados obtidos (figura 16) é possível verificar que existem diferenças significativas entre os ensaios, com a excepção dos dados obtidos para o dia 2 entre a testemunha e o ensaio a 50 μM . De entre estas diferenças destaca-se um aumento significativo do teor de clorofila entre a testemunha e o ensaio a 25 μM (para todos os dias). Para ambas as condições referidas, T e 25 μM de Cd, não se verificaram diferenças significativas entre os tempos de exposição ao Cd testados. Verifica-se que no ensaio de 50 μM existe um teor de clorofila significativamente inferior ao dos restantes ensaios (incluindo o dia 0). No entanto, observou-se um aumento significativo do teor de clorofila total para as amostras expostas a concentrações mais elevadas de Cd (50 μM), e durante tempos mais longo (7 dias), aspecto que deverá ser averiguado em estudos futuros.

É contudo de salientar que não foram observados sintomas visíveis do efeito tóxico do Cd nestas plantas, como por exemplo cloroses, diminuição evidente da biomassa ou da dimensão das folhas (figuras 22, 23 e 24 em anexo e figuras 11, 12, 13 e 14), tal como se verificou nos resultados obtidos nos ensaios realizados. Mas conjugando os resultados da figura 16 com os da figura 15 (teores de cádmio determinados), verifica-se que uma maior concentração de Cd na planta, aos 50 μM , parece originar a diminuição do teor de clorofila, à excepção de tempos de exposição mais longos, que sugerem o despertar de um mecanismo de defesa da planta. Além disso para teores de Cd entre 0,29 e 1,34 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS nas folhas (ensaio 25 μM) verifica-se o aumento do teor de clorofila, que pode surgir de uma possível aptidão do cádmio para conservar directa ou indirectamente a clorofila.

4.3.2. Determinação do teor de clorofila com aparelho *Hansatech*

No gráfico seguinte (figura 17) estão representadas as variações adimensionais do teor de clorofila, para os ensaios realizados, obtidas pelo equipamento portátil *Hansatech*.

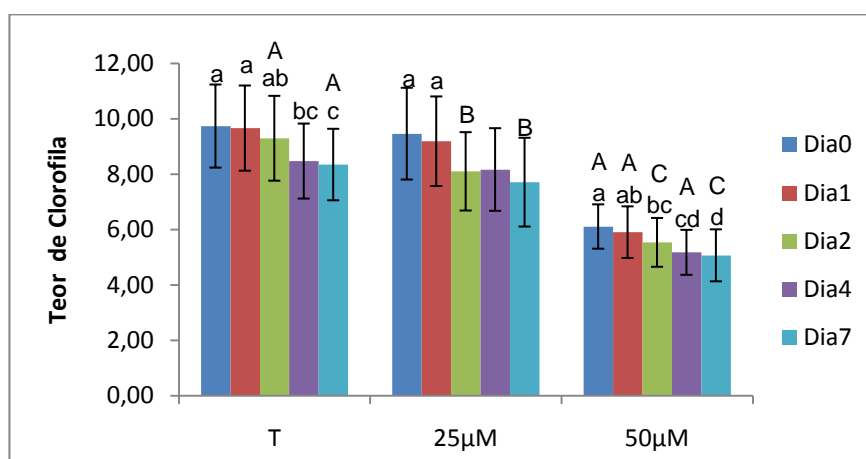


Figura 17 – Teor médio de clorofila (unidades arbitrárias), para os ensaios com 0, 25 e 50 μM de cádmio durante sete dias. As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias de cada dia para cada modalidade de ensaio (T, 25 ou 50), e as maiúsculas indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos ensaios, para cada dia.

Ao contrário do que evidenciaram os resultados representados na figura 16, através da figura 17 verifica-se que o teor de clorofila é significativamente inferior no ensaio a 50 μM face à testemunha, o que reflecte o efeito negativo do cádmio nos teores de clorofila, tal como seria esperado. De facto, os resultados obtidos com o aparelho *Hansatech*, por ser um método não destrutivo, resultam de um número de determinações muito maior que a determinação da clorofila por espectrometria. Isto poderá permitir reduzir a influência da variabilidade do material vegetal nos resultados, o que poderá explicar a obtenção de resultados muito mais aproximados como esperado, e que é referido em

diversos estudos (Pinto *et al.*, 2009). Os valores *Hansatech* apresentados resultam da média de todas as plantas em estudo, obtidos sempre na mesma folha da mesma planta ao longo dos 7 dias, pelo que se podem considerar mais reprodutíveis. Apesar de produzidas sob as mesmas condições as plantas têm inevitavelmente diferenças fisiológicas, o que poderá afectar a amostragem para a determinação de clorofila realizada no ponto anterior mas que podem ser reduzidas pela determinação dos valores *Hansatech*. Entre a modalidade de 25 μM e a T existem diferenças significativas no dia 2 e dia 7, verificando-se efeito significativo do cádmio sob este teor.

Assim, embora a determinação do teor de clorofila por espectrofotometria seja mais objectiva, as determinações através da metodologia *Hansatech* resultam num número muito mais elevado de repetições, podendo ser considerado um método mais representativo e mais preciso. Por esta razão, e para melhor correlacionar e avaliar resultados, foi elaborada uma curva de calibração que permite relacionar o teor de clorofila com as determinações em aparelho *Hansatech*.

Na figura 18 esta representada a correlação estabelecida entre estas duas metodologias, o que permite a utilização, em ensaio futuros, de métodos rápidos e não destrutivos para uma avaliação do teor de clorofila neste material vegetal. Esta correlação é apresentada pela curva descrita na figura 18.

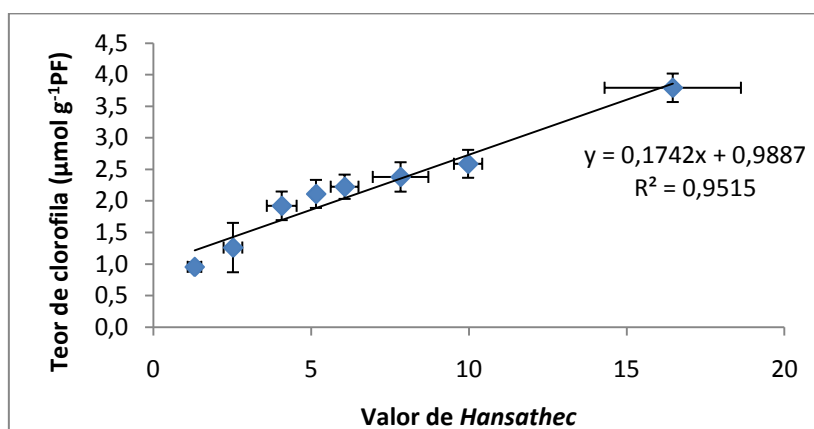


Figura 18 - Curva padrão que correlaciona o valor obtido pelo método *Hansatech* com o teor de clorofila medida no espectrofotómetro. $y = 0,1742x + 0,9887$, $R^2 = 0,9515$.

4.4. Avaliação do efeito do cádmio na peroxidação de lípidos

Na figura 19, apresentada a baixo, são representados os gráficos relativos ao teor de malondialdeído (MDA) formado nas plantas em estudo.

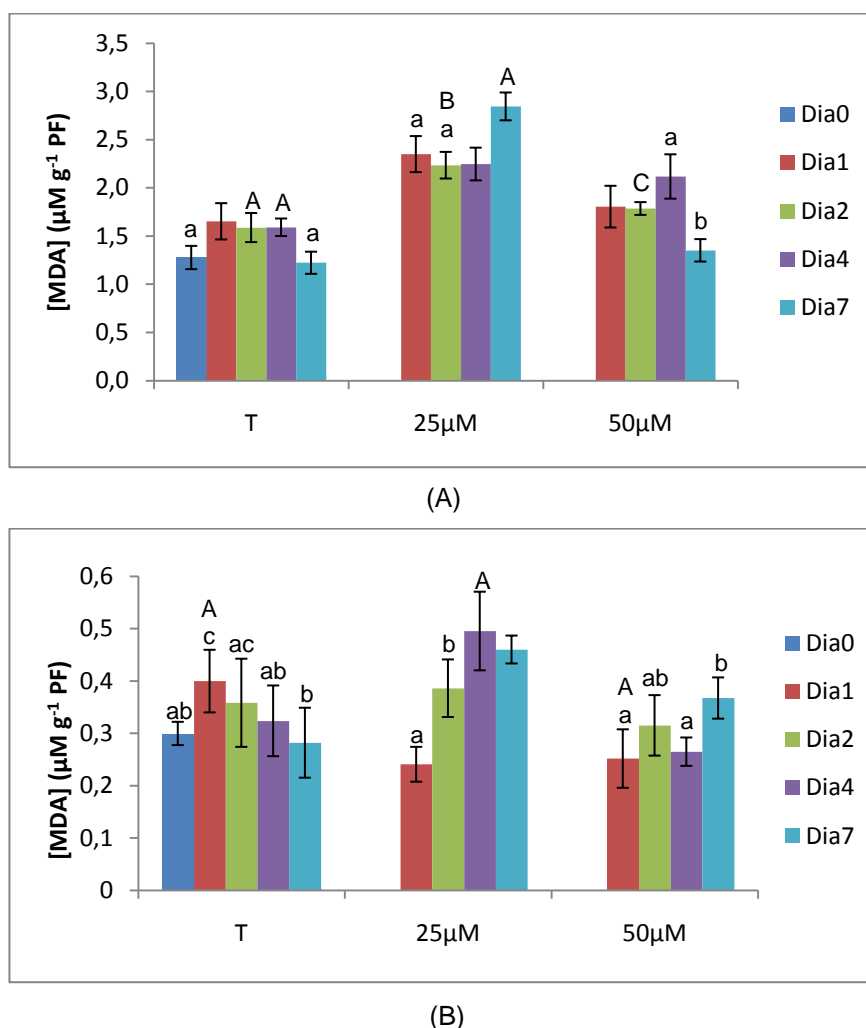


Figura 19 – Concentração média de malondialdeído (MDA) formado em folhas (A) e raiz (B), após a contaminação com 0, 25 e 50 µM de cádmio e ao longo de sete dias. As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias de cada dia para cada modalidade de ensaio (T, 25 ou 50), e as maiúsculas indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos ensaios, para cada dia; $n=3$.

A concentração média de MDA tanto em folhas como raízes é superior no sétimo dia nas plantas contaminadas com 25 µM de cádmio. Pela análise da figura 19 (A) verifica-se que o teor de MDA é significativamente superior no ensaio de 25 µM, face à testemunha e ao ensaio de 50 µM (com a excepção dos dias 1 e 4). Aparentemente estas variações podem ser explicadas por um aumento da destruição lipídica, que é ultrapassado pela possível activação de um sistema de defesa celular apenas a concentrações de cádmio superiores, de 15,78 a 31,48 µg g⁻¹ PF (50 µM).

Não se verifica, ao longo dos dias, uma tendência na variação da concentração de MDA. Para a testemunha e o ensaio a 50 μM observa-se uma descida da concentração deste composto ao 7º dia, ao contrário do que acontece no ensaio com aplicação de 25 μM de cádmio.

Nas raízes, observam-se níveis de MDA cerca de 5 vezes inferiores aos da parte aérea. Na figura 19 (B) pode observar-se que nas raízes a variação entre ensaios é menos significativa do que nas folhas; no entanto, a 25 μM de Cd continua-se a verificar uma maior destruição lipídica, para tempos de exposição ao cádmio mais longos.

Embora não seja evidente uma explicação para os níveis de MDA a 25 μM de Cd serem superiores aos obtidos a 50 μM de Cd, é de salientar, no entanto que no ensaio T, onde não houve exposição das plantas ao Cd, os níveis de MDA praticamente não variam. No entanto, tal como esperado, para cada concentração de Cd testada, observou-se um aumento do MDA celular, com o tempo de exposição ao Cd. Dado este ser um parâmetro indicativo da extensão de danos de natureza oxidativa, e que estes serão uma consequência do excesso de ROS, estes resultados permitem concluir que o cádmio induz alterações que podem resultar de num stresse oxidativo.

4.5. Avaliação do efeito do cádmio na formação de peróxido de hidrogénio

Na figura 20 estão expressas em $\mu\text{g g}^{-1}$ peso fresco, as variações médias do teor de H_2O_2 produzido em folhas e raízes de plantas em estudo.

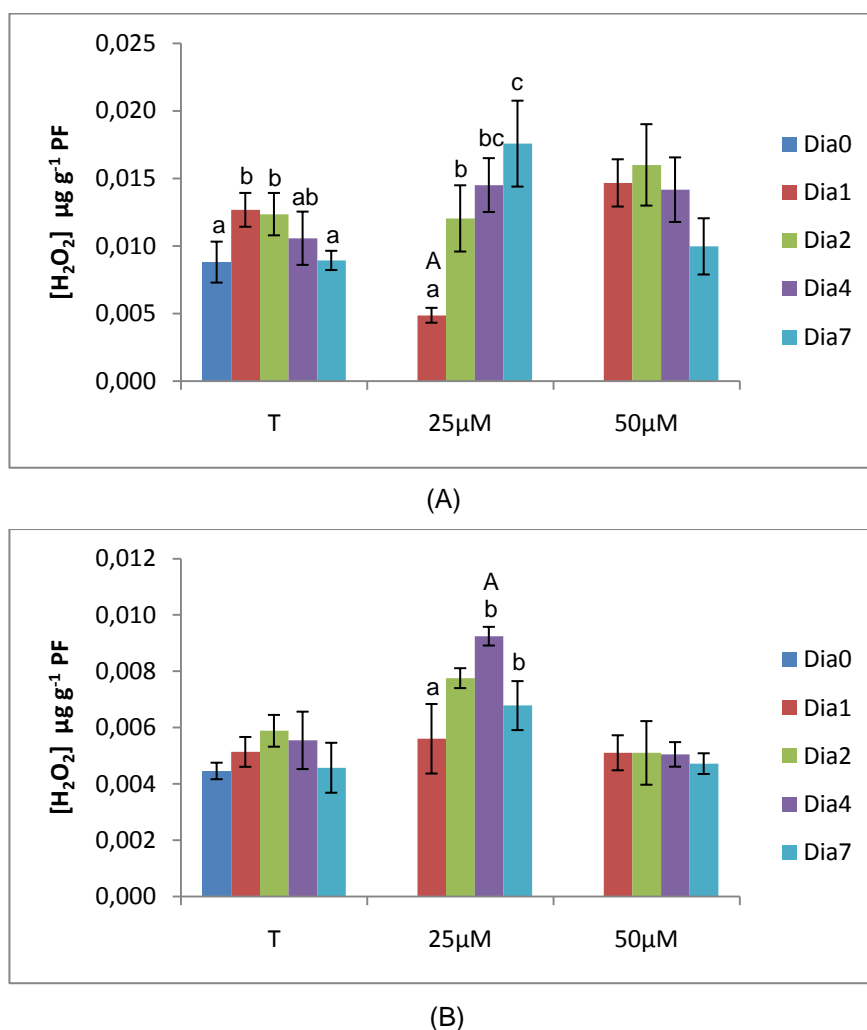


Figura 20 - Concentração média de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) formado em folhas (A) e raiz (B), após a contaminação com 0, 25 e 50 μM de cádmio, e durante sete dias. As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias de cada dia para cada modalidade de ensaio (T, 25 ou 50), e as maiúsculas indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos ensaios, para cada dia; $n=3$.

Por análise da figura 20 (A) é possível verificar que os teores de H_2O_2 mais elevados em folhas foram registados ao sétimo dia para concentrações de contaminação de 25 μM . Contudo para os restantes dias os ensaios não diferem significativamente entre si. Em cada ensaio os teores de H_2O_2 não variam significativamente entre tempos de exposição, com excepção do ensaio a 25 μM que apresenta aumento da concentração deste parâmetro ao longo do tempo.

Nas raízes (figura 20 (B)) não existem diferenças significativas entre ensaios, nem mesmo ao longo do tempo, com a exceção do ensaio a 25 μM no dia 4. Contudo parece existir uma tendência para os valores do ensaio a 25 μM serem superiores aos restantes.

De um modo geral, o teor de cádmio não parece influenciar a produção de H_2O_2 nas folhas e raiz. Contudo, parece existir uma tendência para estes valores serem superiores para concentrações de contaminação na ordem dos 25 μM , sugerindo que quando as concentrações ultrapassam esses limites (cerca de 1,34 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF em folhas e 4,32 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF em raiz) a planta torna-se menos sensível ao Cd.

4.5. Teor de azoto nítrico

Na expectativa de clarificar a questão das alterações visíveis dos teores de clorofila serem poucas ou mesmo nulas, foi efectuada a determinação da concentração média de azoto nítrico em folhas das plantas de espinafre em estudo (figura 21).

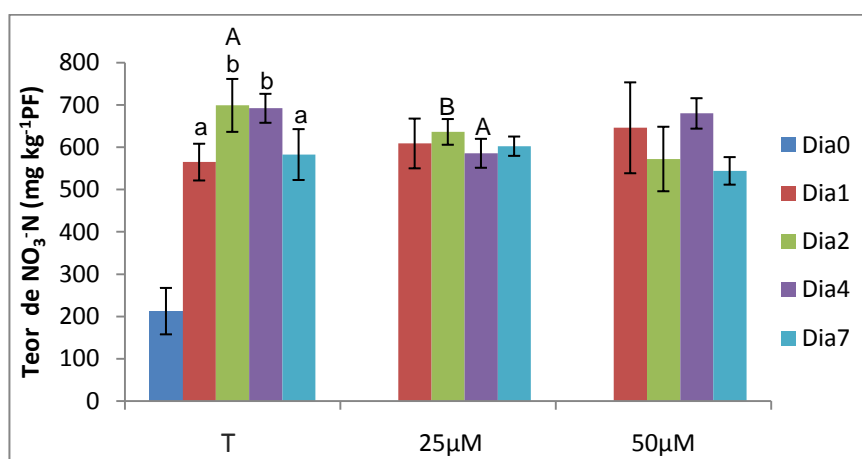


Figura 21 - Concentração média de azoto nítrico (NO_3N) formado nas folhas de espinafre após a contaminação com 0, 25 e 50 μM de cádmio, durante sete dias. As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias de cada dia para cada modalidade de ensaio (T, 25 ou 50), e as maiúsculas indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos ensaios, para cada dia; $n=3$.

Os teores de azoto nítrico determinados variam entre os 544,07 e 698,79 mg kg^{-1} PF, com a exceção da testemunha no dia 0 com um valor claramente inferior de 212,63 mg kg^{-1} PF.

É possível verificar pelo gráfico da figura 21, que nos ensaios de 25 e 50 μM de Cd, não existem variações significativas da concentração de azoto nítrico ao longo do tempo. Curiosamente essas variações existem no ensaio T, sendo a concentração de azoto nítrico significativamente superiores nos dias 2 e 4.

O Cd não interfere, aparentemente, nos teores de azoto nítrico formados nas folhas das plantas em estudo, o que pode explicar o facto de não se terem verificado cloroses acentuadas das folhas, como é geralmente observado noutras situações de fitotoxicidade de metais pesados, ou mesmo noutros estudos do efeito tóxico do Cd em outras plantas (Quelhas, 1991; Pinto *et al.*, 2009).

4.6. Correlações entre os parâmetros³ avaliados

Com o objectivo de relacionar todos os parâmetros analisados foram calculadas as correlações de *Pearson* entre as variações dos parâmetros determinados em relação ao tempo.

O coeficiente de correlação de *Pearson* é a forma mais comum de se estabelecerem correlações entre duas variáveis dependentes mas com comportamento linear, o que pode contudo, constituir uma limitação à sua utilização. No entanto, apesar de não ser uma certeza o facto de os comportamentos de cada parâmetro em estudo ser linear, este tratamento foi considerado importante para a interpretação do conjunto de todos os resultados. Consequentemente, só faz sentido analisar as correlações estabelecidas entre alguns destes parâmetros que se revelaram bastante úteis pois permitem quantificar a dependência de uns parâmetros em relação a outros.

As correlações de *Pearson* foram estabelecidas para cada uma das modalidades de ensaio (T, 25 µM, 50 µM) reactivamente à variação do tempo de exposição ao Cd (0, 1, 2, 4, 7 dias) e os resultados obtidos são apresentados nos quadros seguintes (quadro XI; quadro XII; quadro XIII).

Na análise das correlações realçam-se as que são superiores a 70 %, sendo consideradas correlações elevadas, independentemente do sentido da variação verificada.

Das correlações obtidas para a testemunha, comparando as variações ao longo do tempo dos parâmetros analisados (quadro XI), dá-se ênfase às correlações com o parâmetro biomassa total, mais elevadas. Sabe-se que a biomassa total aumenta ao longo do tempo (crescimento da planta) para a testemunha e como consequência deste aumento dever-se-ia verificar um aumento de MS de folhas e raiz. De facto, existe uma correlação elevada e positiva entre a biomassa total e MS da raiz (81 %), mas a correlação deste parâmetro com MS das folhas apesar de elevada é negativa (- 92 %) o que significa que ao longo do tempo a MS das folhas diminui.

Além destes parâmetros o número de folhas também apresenta uma correlação elevada e positiva com a biomassa total de 88 %.

As correlações entre os teores de MDA e H₂O₂ formados são de 92 % em folhas e de 50 % em raiz. Isto significa que os parâmetros variam de forma semelhante ao longo do tempo no ensaio sem contaminação, nas folhas os teores significativamente mais baixos são no dia 0 e dia 7, na raiz a semelhança é menor.

³ Entenda-se por parâmetros todas as determinações que permitiram obter os resultados descritos nos pontos 4.1; 4.2; 4.3; 4.4 e 4.5.

No quadro XII, em que são apresentadas as correlações de parâmetros ao longo do tempo para o ensaio de 25 μM de Cd, verifica-se que o teor de cádmio nas folhas apresenta elevada correlação com seguintes os parâmetros: comprimento da parte aérea (- 87 %); nº de folhas (85 %); teor de MDA em folhas (81 %); concentração de H_2O_2 em folhas (88 %). Isto significa que com o aumento do cádmio ao longo do tempo foi observada a diminuição da parte aérea, e verificou-se o aumento do número de folhas e o aumento de H_2O_2 e MDA formados (indicadores do excesso de ROS e da ocorrência de danos oxidativos, respectivamente). Além disso, apesar de com uma correlação menor (61 %), a biomassa também aumenta ao longo do tempo com o aumento do teor de cádmio nas folhas.

Nas raízes o teor de Cd também aumenta ao longo do tempo, como já foi verificado em resultados anteriores, e tal como acontece com as folhas, este apresenta uma correlação negativa e elevada com o comprimento da raiz (- 91 %) e elevada positiva com a biomassa (85 %). A correlação com a concentração de MDA em folhas também é elevada e positiva para este ensaio (69 %), no entanto, a correlação obtida em relação ao MDA na raiz não é tão elevada.

Para a aplicação de 25 μM de Cd o teor de clorofila medido pelo *Hansatech* demonstrou uma elevada correlação com os teores de H_2O_2 (- 87 %) e MDA (- 77 %) formados nas folhas, mas uma correlação negativa que significa que os parâmetros variam inversamente. Isso indica que o Cd induz uma diminuição do teor de clorofila e um correspondente aumento de MDA e H_2O_2 como consequência do stresse provocado pelo Cd. Poder-se-ia explicar o efeito do stresse aplicado com 25 μM pelo aumento da formação de H_2O_2 e MDA e também pela diminuição do teor de clorofila determinado pelo *Hansatech*, contudo este efeito não se verificou pela determinação espectrofotométrica e não é detectado visualmente por observação das plantas (figuras 23, 24 e 25 em anexo). Além disso, para o ensaio em que foi utilizada uma concentração de Cd superior, 50 μM , esta correlação não se verificou. Uma possível explicação para este efeito poderá ser o facto de se considerar estas variações como tendo comportamentos lineares quando na realidade isso não acontece para as concentrações de Cd mais elevadas (figura 15). Dado que o aspecto visual das plantas não é afectado de forma evidente, é possível que a planta seja comercializada, apesar do seu teor em Cd.

O teor de azoto nítrico e o teor de clorofila determinados por espectrofotometria apresentam uma correlação quase perfeita de 95 %, o que significa que variam de modo muito semelhante ao longo do tempo.

A correlação entre a biomassa total e MS de raiz (- 44 %) e de folhas (27 %) é baixa contrariamente às correlações destes parâmetros para a modalidade T. Apesar disso, o número de folhas também aumenta com a biomassa total, com uma correlação de 63 %.

No quadro XIII a correlação entre o teor de cádmio em folhas e os parâmetros biomassa total (91 %) e número de folhas (63 %), bem como entre o teor de Cd na raiz e a biomassa total (76%), e as baixas correlações entre teor de Cd e concentração de MDA e H_2O_2 (em folhas 45 % e 34 %; na raiz 59 % e -33 %, respectivamente) demonstram que o cádmio quando em concentrações superiores (15,78 a 31,48 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF em folhas e 16,09 a 78,01 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF na raiz) ou apresenta um efeito indutor

de crescimento ou não interfere no crescimento (acumula-se nos tecidos e a planta desenvolve-se normalmente). Além disso, apesar de menor verifica-se que a correlação entre o teor de Cd nas folhas e o comprimento da parte aérea é tal como no ensaio a 25 μM negativa.

Para a concentração de 50 μM (quadro XIII), a correlação entre a biomassa total e MS de raiz (-16 %) é muito baixa, por outro lado a correlação entre a biomassa total e MS de folhas é de -81 %, o que significa que estes dois parâmetros variam inversamente ao longo do tempo (tal como se verificou no ensaio da testemunha). Por outro lado, tal como na testemunha e no ensaio com 25 μM de Cd, a correlação entre o número de folhas e a biomassa total é de 67 %, o que permite verificar que ambos os parâmetros variam de modo semelhante. A correlação entre a biomassa total e o nº de folhas é positiva para todas as modalidades de ensaio, sendo superior na modalidade T (88 %) face às plantas contaminadas (25 μM de 63 %; 50 μM de 67 %), como esperado.

Assim, quando aplicado a uma concentração de 25 μM , o cádmio parece interferir na fisiologia da planta, diminuindo-lhe o comprimento mas estimulando o aumento da sua massa; para além disso devido ao aumento de teores de H_2O_2 e MDA intracelulares, pode-se afirmar que esta concentração de Cd induz o aumento de ROS e a ocorrência de danos oxidativos na planta.

De facto, embora os efeitos visíveis na planta não sejam muito evidentes, podemos verificar que há indução de stresse oxidativo nas plantas expostas ao Cd. Seria interessante no futuro efectuar mais estudos para avaliar as alterações metabólicas resultantes deste stresse.

Quadro VIII - Correlações entre os parâmetros analisados para a Testemunha.

| T (Testemunha) | | | | | | | | | | | | | |
|---|-----------|------------------|-----------|--------------------|-------------|---------------|--------------|------------|---|---------------------------------------|---------------|-------------------|----------------------------|
| | Raiz (cm) | Parte Aérea (cm) | Nº Folhas | Biomassa total (g) | MS Raiz (%) | MS Folhas (%) | [MDA] Folhas | [MDA] Raiz | [H ₂ O ₂] Folhas | [H ₂ O ₂] Raiz | Azoto Nítrico | Teor de Clorofila | Clorofila <i>Hansatech</i> |
| Raiz (cm) | 1,00 | | | | | | | | | | | | |
| Parte Aérea (cm) | 0,98 | 1,00 | | | | | | | | | | | |
| Nº Folhas | -0,97 | -0,95 | 1,00 | | | | | | | | | | |
| Biomassa total (g) | -0,82 | -0,82 | 0,88 | 1,00 | | | | | | | | | |
| MS Raiz (%) | -0,86 | -0,82 | 0,95 | 0,81 | 1,00 | | | | | | | | |
| MS Folhas (%) | 0,60 | 0,58 | -0,74 | -0,92 | -0,78 | 1,00 | | | | | | | |
| [MDA] Folhas | 0,12 | 0,00 | 0,07 | 0,03 | 0,27 | -0,22 | 1,00 | | | | | | |
| [MDA] Raiz | 0,49 | 0,33 | -0,33 | -0,26 | -0,19 | 0,07 | 0,88 | 1,00 | | | | | |
| [H ₂ O ₂] Folhas | 0,30 | 0,15 | -0,11 | 0,03 | 0,05 | -0,25 | 0,92 | 0,95 | 1,00 | | | | |
| [H ₂ O ₂] Raiz | 0,78 | 0,82 | -0,66 | -0,66 | -0,39 | 0,33 | 0,42 | 0,50 | 0,39 | 1,00 | | | |
| Azoto Nítrico | -0,57 | -0,65 | 0,72 | 0,82 | 0,76 | -0,85 | 0,59 | 0,33 | 0,58 | -0,33 | 1,00 | | |
| Teor de Clorofila | -0,47 | -0,40 | 0,64 | 0,53 | 0,85 | -0,69 | 0,49 | 0,04 | 0,25 | 0,15 | 0,63 | 1,00 | |
| Clorofila <i>Hansatech</i> | 0,99 | 0,95 | -0,95 | -0,87 | -0,82 | 0,66 | 0,22 | 0,55 | 0,34 | 0,82 | -0,56 | -0,43 | 1,00 |

Quadro VIII - Correlações entre os parâmetros analisados para o ensaio com contaminação de 25 µM de cádmio.

| 25 µM (Contaminada) | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-----------|------------------|-----------|--------------------|-------------|---------------|--------------|------------|---|---------------------------------------|---------------|-------------------|----------------------------|-------------|-----------|
| | Raiz (cm) | Parte Aérea (cm) | Nº Folhas | Biomassa total (g) | MS Raiz (%) | MS Folhas (%) | [MDA] Folhas | [MDA] Raiz | [H ₂ O ₂] Folhas | [H ₂ O ₂] Raiz | Azoto Nítrico | Teor de Clorofila | Clorofila <i>Hansatech</i> | [Cd] Folhas | [Cd] Raiz |
| Raiz (cm) | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | |
| Parte Aérea (cm) | 0,83 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | |
| Nº Folhas | -0,88 | -0,63 | 1,00 | | | | | | | | | | | | |
| Biomassa total (g) | -0,57 | -0,28 | 0,63 | 1,00 | | | | | | | | | | | |
| MS Raiz (%) | -0,57 | -0,28 | 0,63 | -0,44 | 1,00 | | | | | | | | | | |
| MS Folhas (%) | 0,59 | 0,52 | -0,39 | 0,27 | -0,80 | 1,00 | | | | | | | | | |
| [MDA] Folhas | -0,86 | -0,65 | 0,97 | 0,43 | 0,29 | -0,55 | 1,00 | | | | | | | | |
| [MDA] Raiz | -0,79 | -0,86 | 0,42 | 0,33 | 0,00 | -0,54 | 0,40 | 1,00 | | | | | | | |
| [H ₂ O ₂] Folhas | -0,86 | -0,74 | 0,55 | 0,55 | 0,06 | -0,49 | 0,48 | 0,94 | 1,00 | | | | | | |
| [H ₂ O ₂] Raiz | 0,13 | -0,17 | -0,57 | -0,22 | -0,23 | -0,01 | -0,59 | 0,49 | 0,33 | 1,00 | | | | | |
| Azoto Nítrico | -0,66 | -0,60 | 0,75 | -0,04 | 0,54 | -0,76 | 0,88 | 0,30 | 0,27 | -0,51 | 1,00 | | | | |
| Teor de Clorofila | -0,59 | -0,67 | 0,55 | -0,26 | 0,55 | -0,84 | 0,73 | 0,41 | 0,28 | -0,24 | 0,95 | 1,00 | | | |
| Clorofila <i>Hansatech</i> | 0,95 | 0,79 | -0,74 | -0,35 | -0,41 | 0,79 | -0,77 | -0,83 | -0,87 | 0,00 | -0,69 | -0,68 | 1,00 | | |
| [Cd] Folhas | -0,99 | -0,87 | 0,85 | 0,61 | 0,04 | -0,51 | 0,81 | 0,83 | 0,88 | -0,06 | 0,60 | 0,54 | -0,92 | 1,00 | |
| [Cd] Raiz | -0,91 | -0,65 | 0,84 | 0,85 | -0,10 | -0,25 | 0,73 | 0,69 | 0,84 | -0,15 | 0,37 | 0,23 | -0,78 | 0,92 | 1,00 |

Quadro XIII – Correlações entre os parâmetros analisados para o ensaio com contaminação de 50 µM de cádmio.

| 50µM (Contaminada) | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-----------|------------------|-----------|--------------------|-------------|---------------|--------------|------------|---|---------------------------------------|---------------|-------------------|----------------------------|-------------|-----------|
| | Raiz (cm) | Parte Aérea (cm) | Nº Folhas | Biomassa total (g) | MS Raiz (%) | MS Folhas (%) | [MDA] Folhas | [MDA] Raiz | [H ₂ O ₂] Folhas | [H ₂ O ₂] Raiz | Azoto Nítrico | Teor de Clorofila | Clorofila <i>Hansatech</i> | [Cd] Folhas | [Cd] Raiz |
| Raiz (cm) | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | |
| Parte Aérea (cm) | 0,04 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | |
| Nº Folhas | -0,71 | -0,17 | 1,00 | | | | | | | | | | | | |
| Biomassa total (g) | -0,75 | -0,65 | 0,67 | 1,00 | | | | | | | | | | | |
| MS Raiz (%) | 0,14 | -0,12 | 0,22 | -0,16 | 1,00 | | | | | | | | | | |
| MS Folhas (%) | 0,81 | 0,21 | -0,49 | -0,81 | 0,63 | 1,00 | | | | | | | | | |
| [MDA] Folhas | -0,29 | -0,47 | -0,26 | 0,51 | -0,61 | -0,62 | 1,00 | | | | | | | | |
| [MDA] Raiz | -0,40 | -0,16 | 0,92 | 0,42 | 0,51 | -0,11 | -0,56 | 1,00 | | | | | | | |
| [H ₂ O ₂] Folhas | -0,40 | -0,27 | 0,00 | 0,56 | -0,89 | -0,84 | 0,84 | -0,36 | 1,00 | | | | | | |
| [H ₂ O ₂] Raiz | -0,44 | 0,40 | -0,08 | 0,15 | -0,88 | -0,70 | -0,62 | -0,43 | 0,77 | 1,00 | | | | | |
| Azoto Nítrico | -0,80 | -0,36 | 0,30 | 0,82 | -0,42 | -0,88 | 0,80 | -0,07 | 0,75 | 0,54 | 1,00 | | | | |
| Teor de Clorofila | -0,26 | -0,26 | 0,78 | 0,32 | 0,76 | 0,13 | -0,59 | 0,94 | -0,56 | -0,68 | 0,07 | 1,00 | | | |
| Clorofila <i>Hansatech</i> | 0,58 | 0,76 | -0,61 | -0,85 | -0,35 | 0,41 | -0,30 | -0,51 | -0,12 | 0,32 | -0,60 | -0,59 | 1,00 | | |
| [Cd] Folhas | -0,83 | -0,55 | 0,63 | 0,91 | 0,10 | -0,68 | 0,45 | 0,40 | 0,34 | 0,05 | 0,83 | 0,40 | -0,92 | 1,00 | |
| [Cd] Raiz | -0,66 | -0,56 | 0,67 | 0,76 | 0,48 | -0,35 | 0,14 | 0,59 | -0,05 | -0,33 | 0,55 | 0,68 | -0,96 | 0,92 | 1,00 |

5. CONCLUSÕES

O cádmio absorvido pelas plantas em estudo foi de 0,29 a 1,34 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF e 15,78 a 31,48 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF em folhas e 0,13 a 4,32 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF e 16,09 a 78,01 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF na raiz, nos ensaios de 25 e 50 μM respectivamente, demonstrando que não ocorreu um aumento proporcionalmente directo.

Os parâmetros fisiológicos avaliados neste trabalho apesar de pouco significativos ($p < 0,05$) indicam que a matéria seca de folhas diminui em plantas contaminadas e a da raiz diminui especialmente em plantas da modalidade de 50 μM de Cd; o número médio de folhas aumenta em plantas contaminadas e a biomassa total é superior em plantas da modalidade de 50 μM . Contudo em plantas do ensaio de 25 μM a biomassa total apresentou-se menor face aos restantes ensaios (T e 50 μM).

O teor de clorofila demonstrou-se menor em plantas da modalidade de 50 μM de Cd tanto determinadas por métodos espectrofotométricos como pelo método *Hansatech*. No entanto, apenas por espectrofotometria foi evidente o aumento do teor de clorofila no ensaio de 25 μM de Cd. Todavia, visivelmente estas alterações não foram detectadas, tal como se pode verificar pelas nas figuras 23, 24 e 25 em anexo.

A nível celular, o teor de MDA formado foi superior tanto nas folhas como na raiz de plantas contaminadas com 25 μM de Cd. Por outro lado, o Cd afectou aparentemente e menos extensamente a concentração de H_2O_2 formado, mas parece existir também uma tendência para estes valores serem superiores no ensaio com 25 μM .

Por avaliação do teor mineral, o Cd absorvido aparenta estimular directa ou indirectamente a absorção de elementos como Zn e Cu pela planta, bem como demonstra suprimir a absorção de outros elementos como o Ca e Mg, sendo o seu efeito mais evidente em plantas contaminadas com 50 μM .

Os resultados obtidos não permitiram concluir com clareza para qual das modalidades é que a planta demonstrou maior sensibilidade. Verificou-se que o Cd interfere no crescimento da planta, no teor de clorofila e na entrada/saída de metais essenciais na planta, contudo não permitiram concluir qual das concentrações conduz a uma resposta mais extensa.

Como consequência, foi necessário recorrer a correlações entre parâmetros que permitiram afirmar que este metal aparentemente interfere na fisiologia da planta quando aplicado a 25 μM , diminuindo o comprimento de raiz e da parte aérea e aumentando a sua massa. Aliado a isso está a indução da formação de substâncias como MDA e H_2O_2 nestas plantas. Para o ensaio de 50 μM de Cd, através das correlações verifica-se que o Cd também interfere na fisiologia por diminuição do comprimento da parte aérea. Contudo esta concentração de Cd tem uma baixa correlação com a formação de MDA e H_2O_2 , evidenciando que o stresse induzido parece provocar danos menos significantes.

Contudo para ambos os ensaios com contaminação existe o aumento da biomassa total e do número médio de folhas ao longo do tempo.

Assim, da avaliação da resposta de plantas de espinafre ao stresse induzido por Cd, reflecte-se que as plantas demonstram-se menos sensíveis para concentrações de Cd na ordem dos 50 μM do que para 25 μM . Os níveis de contaminação aplicados não foram suficientes para causar danos visíveis nas plantas; porém, a concentração de Cd em folhas de plantas contaminadas com 50 μM foi ao sétimo dia de 31,48 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF ultrapassando os limites máximos impostos pela legislação em vigor, 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, o que poderá constituir um problema de saúde pública.

Sem alterações visíveis nas plantas, com aumento de biomassa total e com níveis de Cd nos tecidos destas acima dos limites legais, poder-se-á estar perante um potencial problema de saúde pública. As plantas são, aparentemente, adequadas para consumo contudo os níveis de Cd na parte edível aumentaram ao longo do tempo de exposição, podendo-se propagar na cadeia alimentar por acumulação nos tecidos e consequentemente podem induzir efeitos tóxicos no Homem e noutros animais. Torna-se assim importante compreender mais profundamente o metabolismo inerente à absorção de Cd pelo espinafre para ser possível posteriormente atenuar tais problemas.

6. BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA, D. (2006) Manual de Culturas Horticolas – Volume I. Presença (Ed.). Lisboa.

APEL, K. & HIRT, H. (2004) Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. Rev. Plant Biol.

BAPTISTA, S. (2009) Avaliação da resposta ao stresse oxidativo induzido por cádmio e cobre em plantas de tabaco transformadas e não transformadas. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.

BELITZ, H. D. & GROSH, W. (2004) Food Chemistry. 3rd Ed., Springer (Ed.) Germany.

CASARETT & DOULL'S (2001) TOXICOLOGY – The basic Science of poisons. 6th Ed., Curtis D, Klaassen (Ed.).

CLEMENS, S.; PALMGREN, M.; KRÄMER, U. (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. Review. Plant Science.

CUYPERS, A; PLUSQUIN, M.; REMANS, T.; JOZEFCEZAK, M.; KEUNEN, E.; GIELEN, H.; OPDENAKKER, K.; NAIR, A.R.; MUTERS, E.; ARTOIS, T.J.; NAWROT, T.; VANGRONSVELD, J.; SMEETS, K. (2010) Cadmium stress: an oxidative challenge. Biometals. Springer Science.

DECRETO-LEI N.º 118/2006 de 21 de Junho. *Diário da República nº 118 - I Série - A*. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Lisboa.

DECRETO-LEI N.º 236/98 de 1 de Agosto. *Diário da República nº 176 - I Série - A*. Ministério do Ambiente. Lisboa.

DECRETO-LEI N.º 306/2007 de 27 de Agosto. *Diário da República nº 164 - I Série*. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Lisboa.

DI TOPPI, L. S. & GABBRIELLI, R. (1999) Response to cadmium in higher plants. Environmental and Experimental Botany

DIRECTIVA 98/83/CE de 3 de Novembro. Relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano

FLORA IBÉRICA (2011) Chenopodiaceae: *Spinacea* L. – Volume II. Disponível em: http://www.floraiberica.es/v.2.0/PHP/familias_lista_.php?familia=Chenopodiaceae. Acedido a 11 de Março de 2011.

GOMES, C. (1998) Estudo do efeito do Cádmio no Desenvolvimento de algumas espécies vegetais. Relatório Fim de Curso de Engenharia Agronómica. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.

GOÑÇALVES, I. M. (2000) Fundo Geoquímico, Poluição e Comportamento do Antimónio, Cádmio, Chumbo, Crómio, Estanho e Zinco em Fluvissolos, Relatório Final de Curso de Engenharia Agronómica. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.

INSA (s.d.) Tabela da composição de Alimentos. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Lisboa.

LIN, R.; WANG, X.; LUO, Y.; DU, W.; GUO, H.; YIN, D. (2007) Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere*.

MAKSYMIEC, W. & KRUPA, Z.(2006) The effects of short-term exposure to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany*.

MARTINS, L. & MOURATO, M. (2008) Alterações no metabolismo de plantas em meios contaminados por metais pesados: stresse oxidativo. *Revista Agros*.

MENDES, B. & OLIVEIRA, J. F. (2004) Qualidade da água para consumo humano. Lidel (Ed.). Lousã.

MENGEL, K. & KIRBY, E. A.(2001) Principles of plant nutrition. 5ªEdição. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.

MITHOFER, A.; SCHULZE, B.; BOLAND, W. (2004) Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters*: 1–5 Publishers. Dordrecht.

MITTLER, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Review. *Plant Science*. Elsevier.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G.; TOGNETTI, V. B.; VANDEPOELE, K.; GOLLERY, M.; SHULAEV, V.; BREUSEGE, F. V. (2011) ROS signaling: the new wave?. Review. *Plant Science*. Elsevier.

MOLLER, I. M.; JENSEN, P.E.; HANSSON, A. (2007) Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. Review. *Plant Biological*.

NAVROT, N.; ROUHIER, N.; GELHAYE, E.; JACQUOT, J.P. (2006) Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*.

NISHA, P.; SINGHAL, R.; PANDIT, A. (2004) A study on the degradation kinetics of visual green colour in spinach (*Spinacea oleracea* L.) and the effect of salt therein. *Journal of Food Engineering*. Elsevier

NISHIRA, E.; INOUE, M.; KONDO, K.; TAKAHASHI, K.; NAKATA, N. (2001) Spinach yield and nutritional quality affected by controlled soil water matric head. *Agricultural water management*. Elsevier.

NOCITO, F.; PIROVANO, L.; COCUCCI, M.; SACCHI, G. (2002) Cadmium-induced sulfate uptake in maize roots. *Plant Physiology*.

- PINTO, A. P.; ALVES, A.; CANDEIAS, A.; CARDOSO, A.; VARENNES, A.; MARTINS, L. L.; MOURATO, M. (2009) Cadmium accumulation and antioxidative defences in *Brassica Juncea* L. Czern, *Nicotina tabacum* L. and *Solanum nigrum* L.. Taylor & Francis. International Journal Environmental Anal. Chemistry.
- QUELHAS, J.S. (1991) FERTILIZAÇÃO. Fundamentos da Utilização de Adubos e Correctivos. Ed. Europa-América.
- RAO, K.V. & SRESTY, T.V. (2000) Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. Plant Science. Elsevier.
- REGULAMENTO(CE) N.º 629/2008 de 2 de Julho. Altera o Regulamento (CE)N.º1881/2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios.
- REICHMAN, S. M. (2002) The Responses of Plants to Metal Toxicity: A review focusing on Copper, Manganese and Zinc. Australian Minerals & Energy Environment Foundation.
- SANDALIO, L. M.; DALURZO, H. C.; GOMEZ, M.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; DEL RIO, L. A. (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. Journal of Experimental Botany. Elsevier.
- SCANDALIOS, J. G. (2002) The Rise of ROS. Elsevier.
- SHOKARZADEH, M.; SHOKRAVIE, M.; EBADI, A.G.; BABEE, Z.; TARIGHATI A. (2007) The measurement of nitrate and nitrite content in leek and spinach sampled from central cities of Mazandaran state of Iran. American-Eurasien J. Agric & Environ. Sci.
- SILVA, H. (2006) Determinação do teor de metais pesados em produtos vegetais frescos – Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Eng. Alimentar. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- SIMS, D. A. & GAMON, J. A. (2002) Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. Remote Sensing of Environment. Elsevier.
- SINGH, N.; MA, L.; SRISVASTAVA, M.; RATHINASABAPATHI, B. (2006) Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L. and *Pteris ensiformis* L.. Plant Science. Elsevier.
- SINHA, S.; MALLICK, S.; MISRA, R.; SINGH, S.; BASANT, A.; GUPTA, A. (2006) Uptake and translocation of metals in *Spinacea oleracea* L. Grown on tannery sludge - amended and contaminated soils: Effect on lipid peroxidation, morpho-anatomical changes and antioxidants. Chemosphere. Elsevier.
- VANGRONSVELD, J., AND H. CLIJSTERS (1994) Toxic effects of metals. In *Plants and the chemical elements. Biochemistry, uptake, tolerance and toxicity*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft.
- VARENNES, A. (2003) Produtividade dos Solos e Ambiente. Escolar (Ed.).

ANEXO

Figura 22 – Imagens de plantas de espinafres recolhidas ao longo do ensaio testemunha, a régua tem um comprimento de 50 cm.



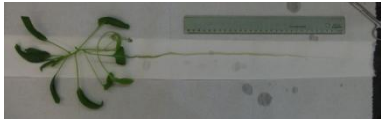
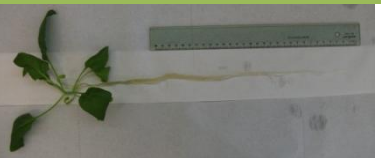

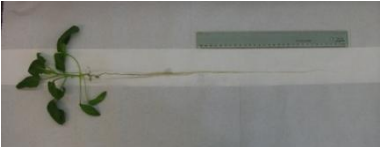





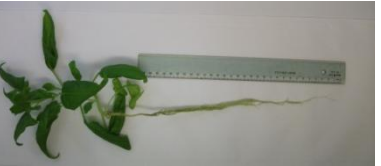
| | | | | | |
|-----|-------|--|---|--|--|
| (T) | Dia 0 |  |  |  |  |
| | Dia 1 |  |  |  |  |
| | Dia 2 |  |  |  | |
| | Dia 4 |  |  | | |
| | Dia 7 |  |  |  |  |

Figura 23 – Imagens de plantas de espinafres recolhidas ao longo do ensaio de 25 µM, a régua tem um comprimento de 50 cm.

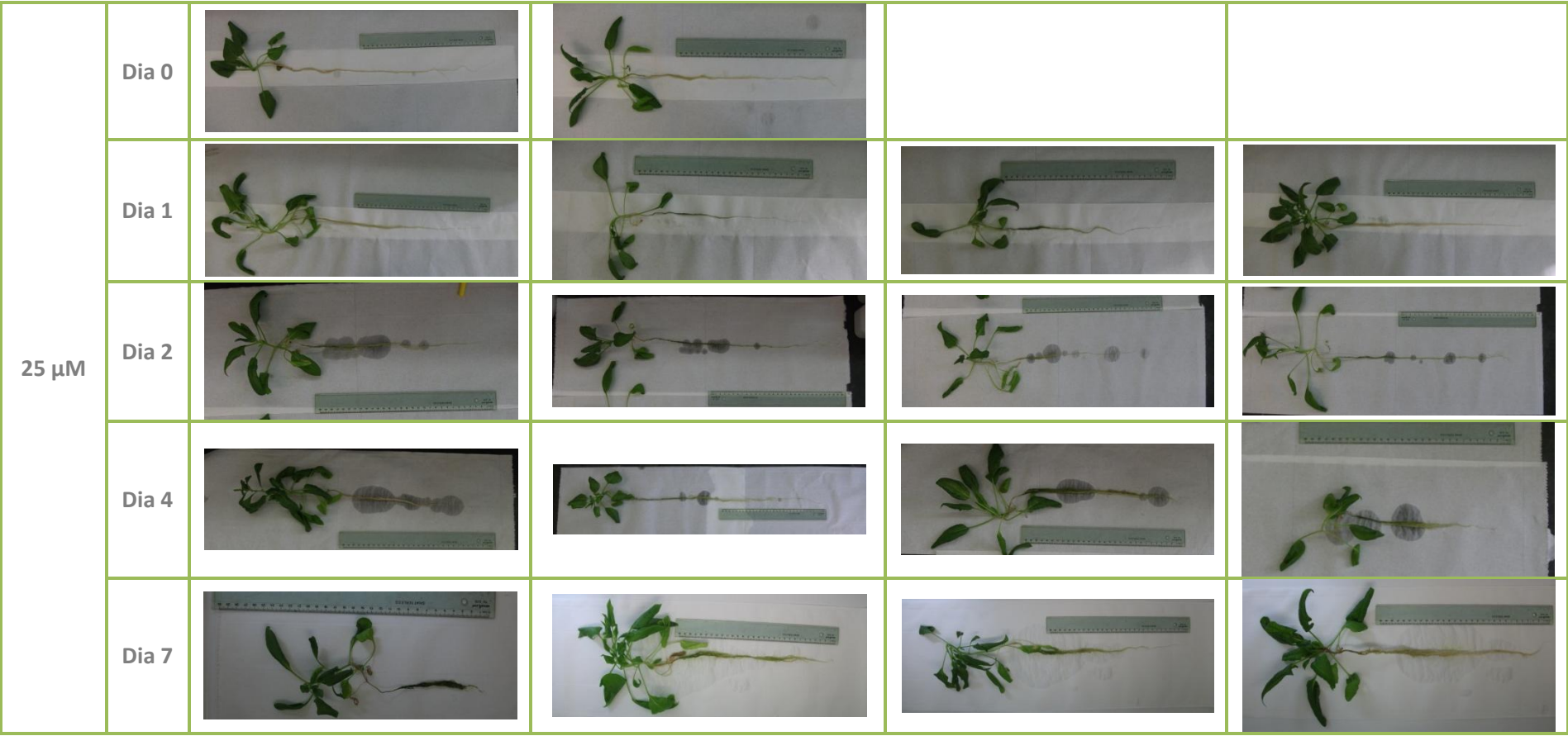


Figura 24 – Imagens de plantas de espinafres recolhidas ao longo do ensaio de 50 μ M, a régua tem um comprimento de 50 cm.

